



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**DETERMINACIÓN DEL DAÑO AL ADN CAUSADO POR EL IODO-
131 EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO EN
CONDICIONES DE NORMOXIA VS HIPOXIA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

FISICO

PRESENTA:

SALVADOR GONZALEZ GUADARRAMA

DIRECTORES DE TESIS:

DR. EN C. EUGENIO TORRES GARCIA

DRA. EN C.S LILIANA ARANDA LARA

Índice

1. INTRODUCCION	4
2. Marco Teórico	5
2.1 Decaimiento radiactivo	5
2.1.1 Radionúclido	5
2.2 Tipos de Decaimiento	6
2.2.1 Decaimiento gamma	6
2.2.2 Decaimiento alfa	6
2.2.3 Decaimiento Beta Negativo	7
2.2.4 Decaimiento beta positivo	8
2.2.5 Esquema de decaimiento I-131	8
2.3 Interacción de las partículas cargadas con la materia	10
2.3.1 Excitación	10
2.3.2 Ionización	11
2.3.3 Aniquilación	12
2.3.4 Bremsstrahlung	13
2.4 Efecto biológico de la radiación ionizante	14
2.4.1 Estructura del ADN	14
2.4.2 Efecto directo e indirecto de la radiación	16
2.4.3 Daño al ADN: tipos de rompimientos	19
2.4.4 Hipoxia y Radiación	19
3. Técnicas de evaluación del daño en al ADN	20
3.1 Ensayo cometa	20
3.3 Fundamento de la electroforesis	23
3.4 Microdosimetría	23
3.5 Simulación monte Carlo	26
3.6 Código MCDS	28

3.7 Glioma Humano	30
4. METODOLOGIA	30
4.1 Cultivo Celular e Inducción De Hipoxia	30
4.2 Calculo Experimental por Ensayo Cometa de DSB.....	31
4.3 Cálculo del espectro de energía de electrones secundarios del I-131.....	32
4.4 Cálculo por Monte Carlo de SSB y DSB	33
5. Resultados y Análisis	34
5.1 Resultados Experimentales	34
5.1.1 Ensayo Cometa	34
5.2 Resultados de Simulación	37
5.2.1 Espectro de electrones secundarios	37
5.2.2 Espectro beta	38
5.2.3 Daño al ADN SSB Y DSB	38
6. Conclusiones	42
7. Referencias.....	43

1. INTRODUCCION

La radiación ionizante se puede definir como energía que se propaga en forma de partículas o por ondas electromagnéticas que se emite por átomos inestables (Hall & Willson, n.d.). La radiación ionizante tiene aplicaciones dentro de la medicina, una de ellas es en Radioterapia, modalidad terapéutica que produce daño tejidos tumorales utilizando altas dosis de radiación (Olive & Banáth, 2006). Sin embargo, muchas veces el efecto terapéutico de la radiación ionizante no es efectivo debido a que existen condiciones y/o características celulares que favorecen el crecimiento y resistencia de las células de cáncer al tratamiento, como por ejemplo la presencia de regiones hipóxicas (Olive & Banáth, 2006). Tales condiciones se asocian con un resultado clínico deficiente (Begg, Stewart, & Vens, 2011), debido a que la baja concentración de oxígeno disminuye la producción de radicales libres, los cuales juegan un papel importante en el efecto indirecto de la radiación ionizante (Jawhari et al., 2016; La coeuille et al., 2018; Wei et al., 2011). El glioblastoma (GBM) es una neoplasia intracraneal humana que se caracteriza por un alto grado de células hipóxicas que lo hace menos susceptible a la quimioterapia y radioterapia (Jawhari et al., 2016; La coeuille et al., 2018; Wei et al., 2011).

Los efectos biológicos de la radiación dependen de la interacción con células, principalmente con el ADN, las cuales producen roturas de doble hebra de ADN (DSB), roturas de una sola hebra (SSB) y daño agrupado no DSB (lesiones de base). Autores afirman que la efectividad biológica de la radiación depende, de la calidad de la radiación y la concentración de oxígeno (Bristow y Hill, 2008; Stewart et al., 2011). Los DSB tienen mayores efectos biológicos e inducen mayor muerte celular que las lesiones individuales (Santivasi y Xia, 2014). Simulaciones Monte Carlo han comparado el número de DSB que producen las partículas beta o la radiación gamma en condiciones normóxicas e hipóxicas. Dichos estudios han

demostrado que el daño al ADN en condiciones hipoxicas es 2 a 3 veces menor que el daño producido en condiciones normóxicas (Stewart et al., 2011; Ward, 1988).

El I-131 es un emisor de partículas β^- y de fotones γ , con una vida media de 8.05 días. La energía máxima de las partículas β es 0.606 MeV (89.7%) con alcance de ~ 3 mm en tejido, lo que garantiza un tratamiento local. Los fotones γ tienen energía de 0.364 MeV (80.9%) y se utiliza para obtener imágenes gammagráficas. Las características físicas emisión del ^{131}I garantizan mayor irradiación de los tejidos por lo que es ampliamente aceptado y utilizado con mayor frecuencia para el tratamiento del hipertiroidismo (Muhammad, 2018).

Dado que es importante conocer el daño al ADN en células de glioblastoma humano en condiciones de hipoxia, el objetivo del presente trabajo fue estimar y comparar el daño al ADN y su relación con el número de DSB producido por las emisiones del ^{131}I en células de glioblastoma humano (U87MG) en condiciones de normoxia e hipoxia.

2. Marco Teórico

2.1 Decaimiento radiactivo

2.1.1 Radionúclido

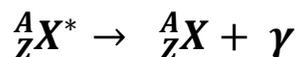
Si un núcleo no se encuentra en un estado estable, expulsa partes de su núcleo para buscar un estado más estable (Powsner, n.d.) y la energía que es liberada del núcleo se conoce como radiación ionizante, la cual puede ser partículas alfa, partículas beta o rayos gamma y a este proceso se le conoce como desintegración radioactiva (Drinking, Clearinghouse, & Sheet, n.d.).

2.2 Tipos de Decaimiento

Cuando un isotopo radiactivo emite radiación para transformar su núcleo en otro, dependen del tipo de elemento y de la proporción del número de protones y neutrones. Los tipos de decaimiento son: Decaimiento gama, Decaimiento alfa, Decaimiento beta positivo y Decaimiento beta negativo.

2.2.1 Decaimiento gamma

Este tipo de desintegración ocurre cuando un núcleo cambia de un estado de mayor energía a uno de menor energía a través de emisión de radiación electromagnética, y a diferencia del decaimiento beta y alfa no implica un cambio en el elemento. Podemos describir la reacción nuclear que describe la descomposición gamma como



donde * está indicando el estado excitado (Rules & Decay, n.d.).

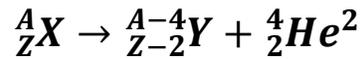
La desintegración gamma ocurre con mayor frecuencia después de una desintegración alfa o beta, debido a que el núcleo cambio a un elemento diferente o libero partículas subatómicas. Debido a que se está liberando energía y no partículas, los valores de **A** y **Z** permanecen iguales (Know & Rutherford, 2015).

2.2.2 Decaimiento alfa

Durante la desintegración alfa, el núcleo puede alcanzar un estado más estable cuando emite una partícula alfa y se convierte en un núcleo con cuatro unidades menos de número másico y dos unidades menos de número atómico a lo que se

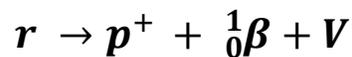
puede considerarse como una emisión de núcleos de Helio 4 (${}^4\text{He}$) (Know & Rutherford, 2015).

La reacción nuclear que describe la descomposición alfa se puede describir de la siguiente manera:



2.2.3 Decaimiento Beta Negativo

Cuando un núcleo tiene exceso de neutrones puede lograr estabilidad mediante un proceso en el cual un neutrón se convierte en un protón y en una partícula beta. El protón se queda en el núcleo pero la partícula beta se emite del núcleo (figura 2.2.4). A este proceso se le conoce como decaimiento beta negativo. La partícula beta que se genera se convierte en un electrón libre que viaja en el medio hasta interactuar con átomos (Powsner, n.d.). La reacción nuclear que describe la descomposición beta negativa se puede describir de la siguiente manera



Una aplicación de las partículas beta negativas es en radioterapia, por ejemplo el I-131 es un emisor de partículas β^- y de fotones γ , con una vida media de 8.05 días. La energía máxima de las partículas β^- es 0.606 MeV (89.7%) con alcance de ~ 3 mm en tejido, lo que garantiza un tratamiento local. Los fotones γ tienen energía de 0.364 MeV (80.9%) y se utiliza para obtener imágenes gammagráficas. Las características físicas de emisión del I-131 garantizan mayor irradiación de los tejidos por lo que es ampliamente aceptado y utilizado con mayor frecuencia para el tratamiento del hipertiroidismo (Muhammad, 2018).

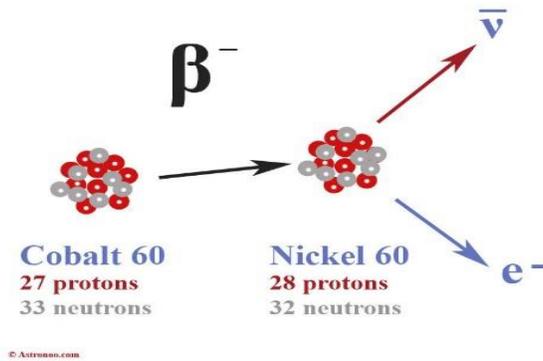
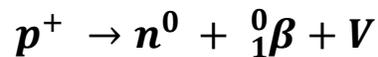


Figura 2.2.4 Decaimiento beta negativo.
<http://www.astronoo.com/es/articulos/neutrino.html>

2.2.4 Decaimiento beta positivo

La desintegración beta positiva implica que un protón se descompone en un neutrón y un positrón mientras que también libera un neutrino para conservar el momento (Know & Rutherford, 2015).



A diferencia del electrón negativo, el positrón que se genera de la desintegración beta positiva, sobrevive brevemente ya que se encuentra rápidamente con un electrón y ambos se aniquilan (Powsner, n.d.).

2.2.5 Esquema de decaimiento I-131

La desintegración de un núcleo desde un estado inestable a un estado estable puede ocurrir con la producción de partículas y fotones. El nivel superior del esquema es el estado con la mayor energía y a medida que el nucleído se desintegra pierde energía y/o partículas por lo tanto los niveles horizontales más

bajos (Figura 2.2.5) representan estados de energía relativamente más baja y las flechas direccionales de un nivel al siguiente indican el tipo de decaimiento (Powsner, n.d.).

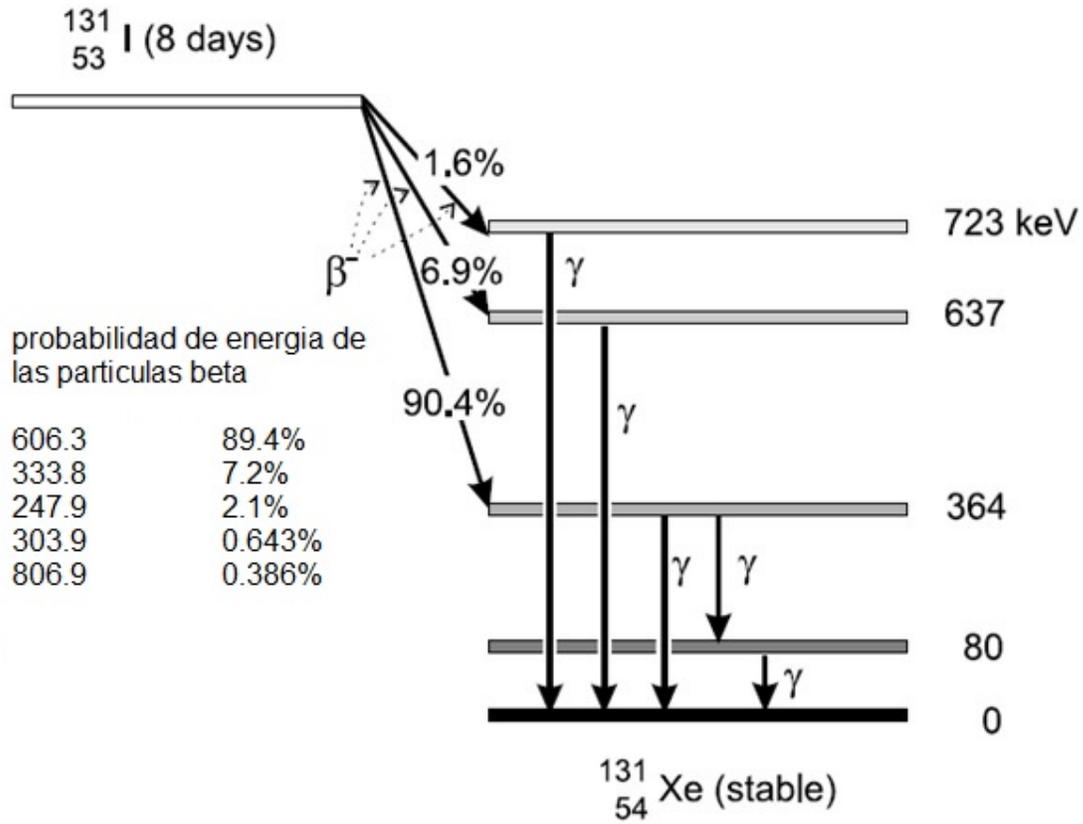


Figura 2.2.5 Esquema de decaimiento del iodo-131. Powsner (2006)

2.3 Interacción de las partículas cargadas con la materia

Debido a que existe una fuerza eléctrica entre una partícula cargada (*PC*) y los átomos de un absorbente, las *PC* pueden ser detenidas por la materia con relativa facilidad a medida que pasan a través de la materia.

Ya que los electrones son partículas cargadas, al chocar un electrón altamente energético con un blanco de número atómico alto, se producen rayos X esto debido a que los electrones sufren una deflexión abrupta producida por las fuerzas coulombianas.

Al interaccionar las *PC* con los átomos del medio, pierden gradualmente energía cinética a lo largo de su trayectoria. Toda o parte de la energía se transfiere al medio hasta que la partícula se frena en su totalidad. La pérdida de energía por unidad de longitud depende de la carga, velocidad y energía de la partícula incidente, así como del número atómico, densidad y energía de ionización promedio del medio (Attix, 2004). Las *PC* interaccionan con la materia en distintas formas: ionización y excitación.

2.3.1 Excitación

Las *PC* (alfas, betas y positrones) interactúan con los electrones que rodean el núcleo del átomo al transferir parte de su energía. La energía transferida desde una partícula de baja energía a menudo solo es suficiente para golpear un electrón desde una capa interna a una capa externa del átomo (Powsner, n.d.).

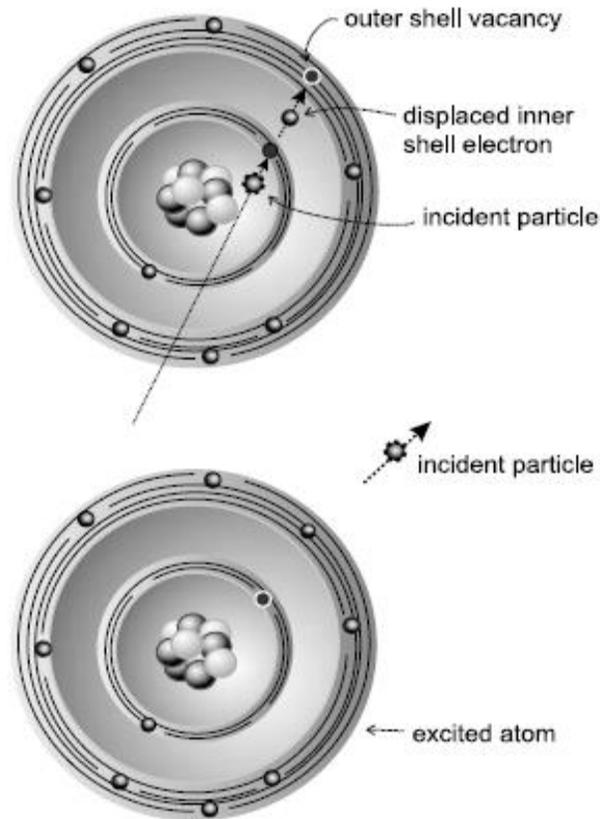


Figura 2.3.1 Excitación por partículas cargadas. Rachel A. Powsner and Edward R. Powsner. (2006). Essential Nuclear Medicine Physics. Blackwell Publishing.

2.3.2 Ionización

Las *PC* también pueden transferir energía a un electrón que generalmente se encuentran en la capa externa y expulsarlo del átomo (Powsner, n.d.). Dicha interacción genera una vacancia y produce un ion con carga positiva. La vacancia que se genera en la capa se ocupa rápidamente por un electrón y emite un rayo x característico. La ionización no solo se limita a la interacción de partículas cargadas con la materia ya que el efecto fotoeléctrico y las interacciones compton son un ejemplo de las interacciones de fotones con la materia que producen ionización (Powsner, n.d.).

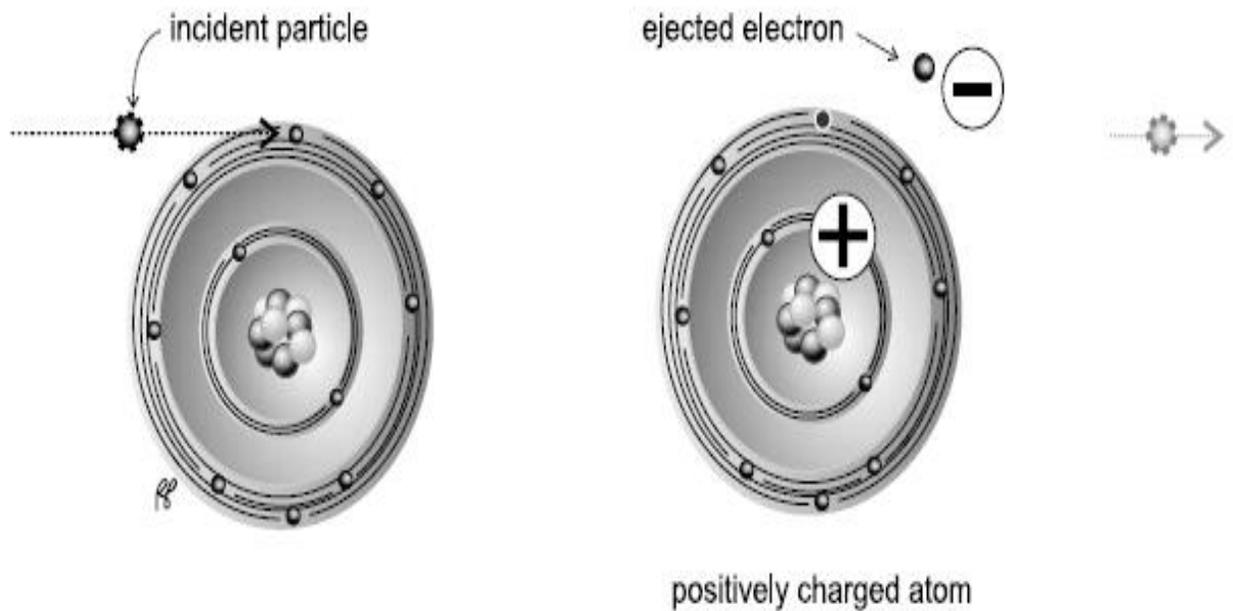


Figura 2.3.2 Ionization. Rachel A. Powsner and Edward R. Powsner.(2006). Essential Nuclear Medicine Physics. Blackwell Publishing.

2.3.3 Aniquilación

En este tipo de interacción con la materia, se involucra un positrón y un negatrón, cuando un positrón transfiere la mayor parte de su energía cinética por ionización y excitación este se combina con un negatrón libre, dado que esta interacción es explosiva debido a que el positrón y el negatrón tienen una masa igual pero una carga eléctrica opuesta y al interaccionar, la masa de las dos partículas se convierte en energía en forma de dos fotones los cuales se dirigen en sentidos opuestos con una energía de 511 keV cada uno (Powsner, n.d.).

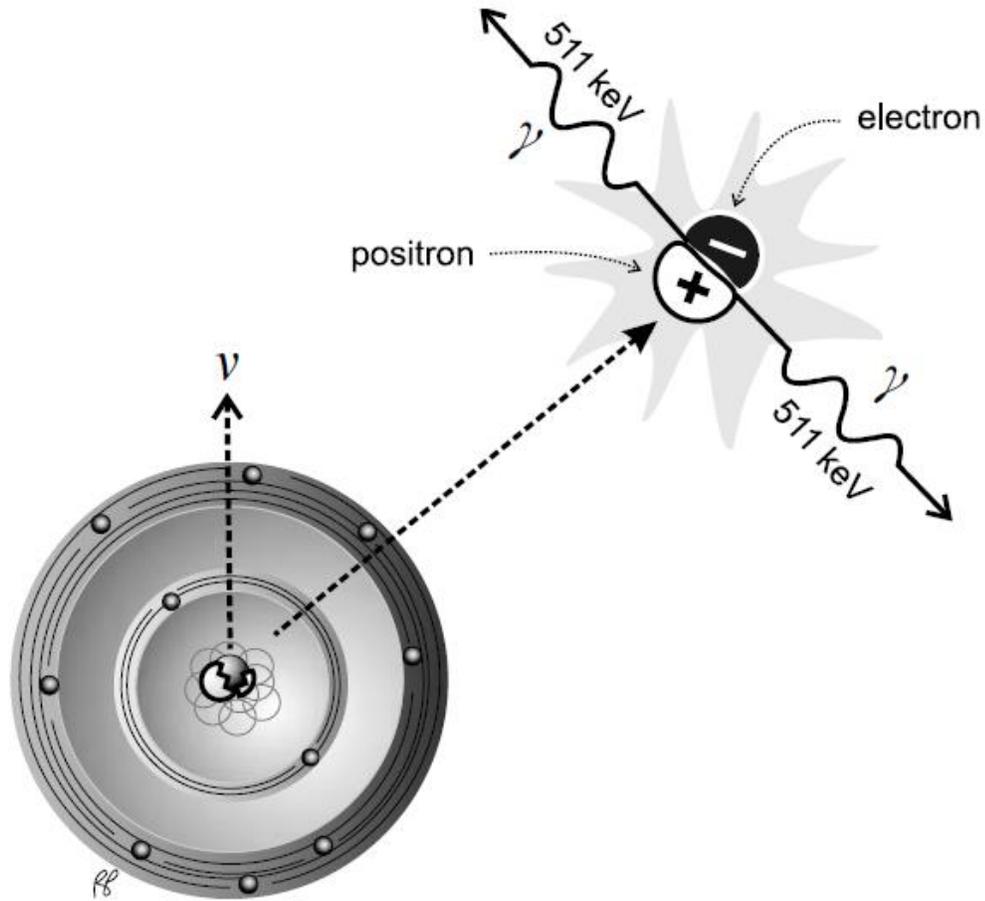


Figura 2.3.3 Aniquilación. Rachel A. Powsner and Edward R. Powsner.(2006).Essential Nuclear Medicine Physics. Blackwell Publishing.

2.3.4 Bremsstrahlung

En este tipo de interacción la partícula cargada se "frena" o se "desvía" en su interacción con los átomos del medio y como resultado emite ondas electromagnéticas, esta radiación se conoce como radiación de frenado o Bremsstrahlung. Este proceso, se produce con mayor probabilidad en las proximidades del núcleo atómico como consecuencia de pequeñas desviaciones de la partícula incidente, ocasionadas por las cargas eléctricas del núcleo.

Las interacciones de las PC se dividen en tres categorías dependiendo del tamaño del parámetro de impacto b comparado con el radio atómico a como se muestra en

la Figura 2.3.4 donde el parámetro de impacto es la distancia a la que se encuentra la partícula incidente del núcleo atómico de los átomos del medio. Entre menor sea el parámetro de impacto mayor será la colisión (La, Con, & Materia, 2013).

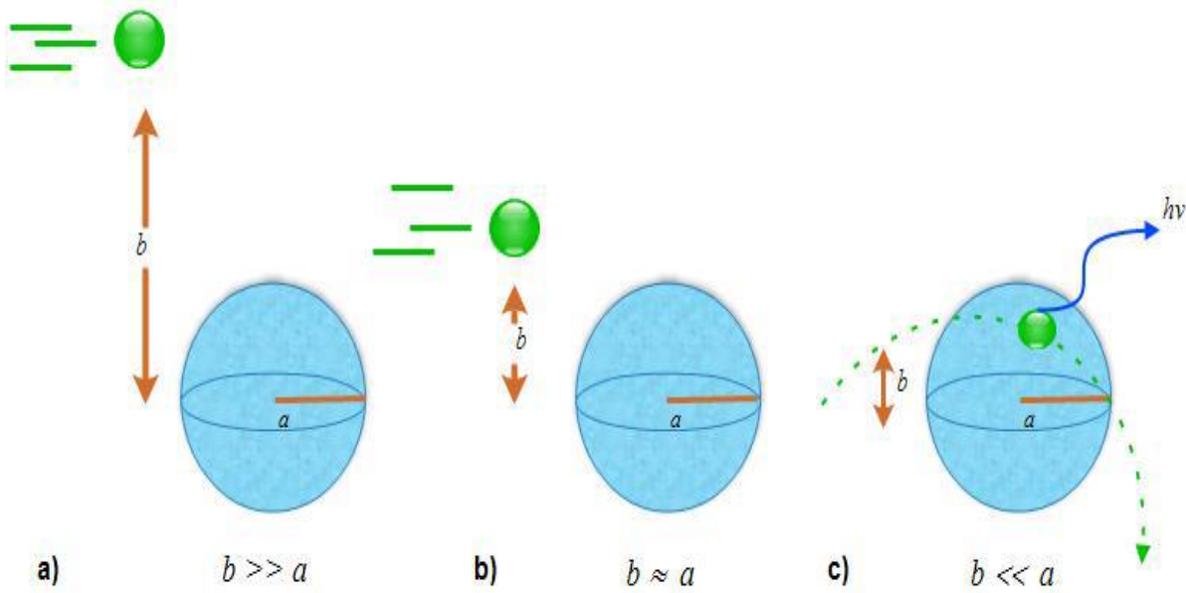


Figura 2.3.4 Esquema de los tipos de colisiones para una PC con un átomo dependiendo del parámetro de impacto "b" y el radio del átomo "a": a) colisión suave) colisión fuerte y c) producción de Bremsstrahlung.

2.4 Efecto biológico de la radiación ionizante

2.4.1 Estructura del ADN

La comprensión de la estructura del ADN, deducida en 1953 por James Watson y Francis Crick, ha sido la base para la biología molecular actual. En la época de los trabajos de Watson y Crick se sabía que el ADN era un polímero compuesto de cuatro nucleótidos: dos purinas (adenina [A] y guanina [G]) y dos pirimidinas (citosina [C] y timina [T]) las cuales se encuentran unidas a azúcares. Dado el papel

central del ADN como material genético, la elucidación de su estructura tridimensional parecía crítica para entender su función (La CELULA quinta edición et al., n.d.).

El enfoque de Watson y Crick del problema estuvo muy influenciado por la descripción de Linus Pauling de las uniones por puentes de hidrogeno y la α -hélice, un tipo común de estructura secundaria de las proteínas. Se obtuvo además información experimental sobre la estructura del ADN con los estudios de cristalografía por refracción de rayos X llevados a cabo por Maurice Wilkins y Rosalind Franklin. El análisis de estos datos reveló que el ADN es un hélice que da un giro cada 3.4nm y que la distancia entre base es de 0.34nm, por lo que en cada vuelta de la hélice hay 10 bases. Un dato importante es que el diámetro de la hélice es de 2nm, sugiriendo que está compuesto de dos cadenas de ADN (La CELULA quinta edición et al., n.d.).

A partir de estos datos Watson y Crick construyeron su modelo del ADN (*figura 2.4.1*). La principal característica es que se trata de una doble hélice con el esqueleto azúcar-fosfato en el exterior de la molécula. Las bases están en el interior, orientadas de tal forma que se forman enlaces de hidrogeno entre purinas y pirimidinas de cadenas opuestas. El apareamiento de las bases es muy específico: A siempre se empareja con T y G con C. Esto explica los resultados previos de Erwin Chargaff, quien analizó la composición de diversos ADN y encontró que la cantidad de adenina era siempre equivalente a la de timina, y la cantidad de citosina a la de guanina. A causa de esta especificación en el apareamiento de bases las dos hebras de ADN son complementarias es decir cada hebra contiene toda la información necesaria para especificar la secuencia de bases de la otra (La CELULA quinta edición et al., n.d.).

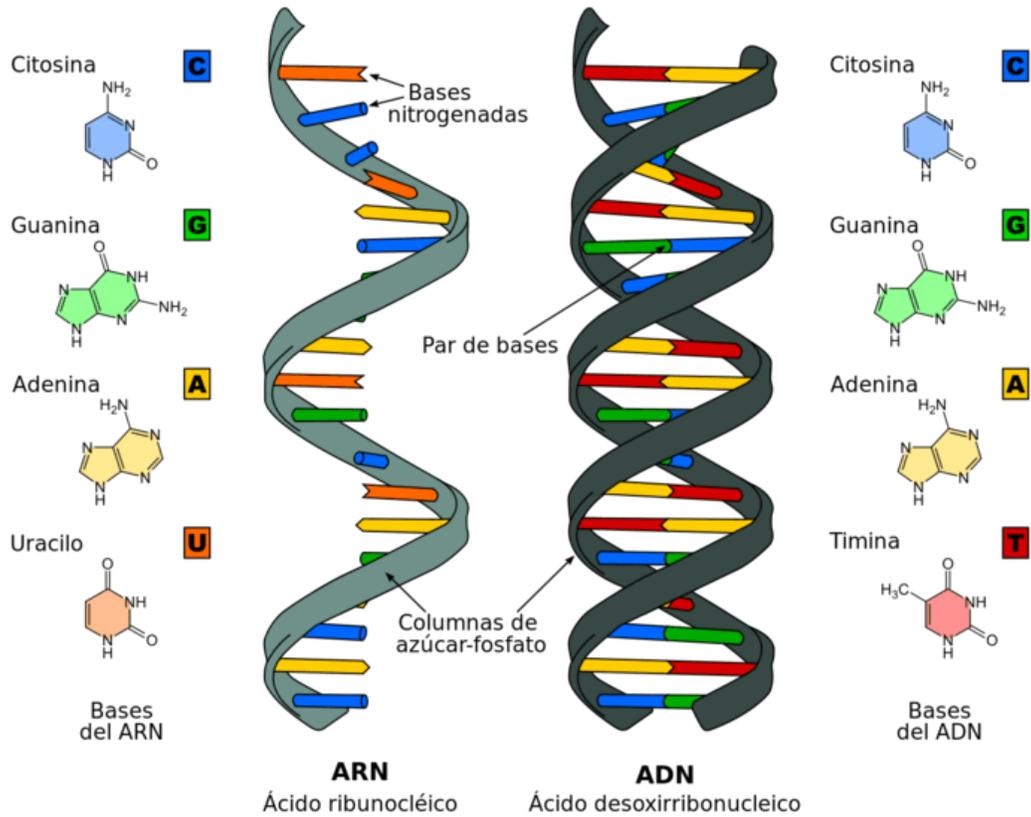


Figura 2.4.1 Estructura del ADN. periodicosalud.com.

2.4.2 Efecto directo e indirecto de la radiación

La radiación ionizante produce efectos biológicos a través de dos mecanismos: el directo e indirecto *Figura 2.4.2*. El efecto directo involucra reacciones de oxidación de un electrón mientras que el efecto indirecto es mediado por la disociación del agua, permitiendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como: radicales de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidróxilo ($\cdot OH$) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) como: peroxinitrato (ONO_2^-) y óxido nítrico (NO). A diferencia de $\cdot OH$ que es una especie muy reactiva y se difunde hasta 4 nm, el ONO_2^- puede difundirse fácilmente dentro de las células y en

su forma protonada (ONOH) puede causar daño en el ADN, muerte celular así como peroxidación de proteínas y lípidos (Cámara Navarro, 2005).

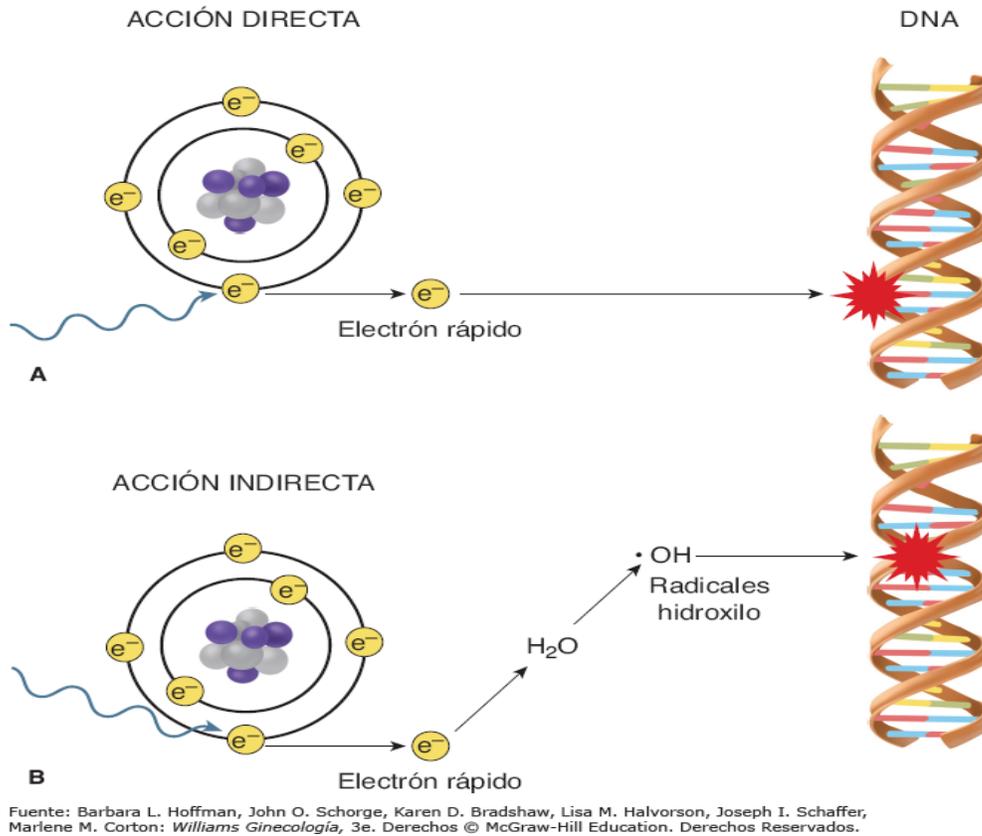


Figura 2.4.2 Acción directa e indirecta de las partículas cargadas sobre el ADN. accessmedicina.mhmedical.com (2017).

La distancia que recorren las partículas cargadas (α y β) en el medio, corresponde con el tamaño de dichas partículas, por ejemplo, las partículas beta tienen un alcance en el tejido de hasta 12 mm *Figura 2.4.3*, lo que puede ser equivalente a 100 diámetros celulares. Las partículas pueden perder y depositar su energía cinética total o parcialmente durante su trayectoria, lo que permite la eliminación de células que se encuentran adyacentes a la célula. A largo de la trayectoria de las partículas α y β en el medio se pueden generar diferentes densidades de ionización que dependen de la energía y de la velocidad de la partícula y del número atómico

del medio. Las partículas α son consideradas altamente ionizantes ya que forman clústeres con alta densidad de ionización, mientras que las partículas β son consideradas poco ionizantes, por lo que, su eficacia terapéutica implica alta concentración del radionúclido dentro del tejido blanco. Con el fin de determinar el efecto biológico de la radiación ionizante, se ha introducido el concepto de transferencia lineal de energía (LET), el cual es una aproximación usada para estudiar la distribución espacial de la ionización y excitación producidos a los largo de la trayectoria de la radiación ionizante. Este asume que la energía se deposita de manera continua y progresiva a través de la materia y se expresa como la relación que hay entre la energía liberada por la radiación ionizante en cierta distancia ($\text{keV}/\mu\text{m}$). Muchos de los radionúclidos utilizados para terapia, tales como ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{186}Re , o ^{67}Cu , emiten radiación de bajo LET de $0.2 \text{ keV}/\mu\text{m}$ en forma de partículas β , electrones de conversión interna, así como también rayos X y gamma (Cámara Navarro, 2005).

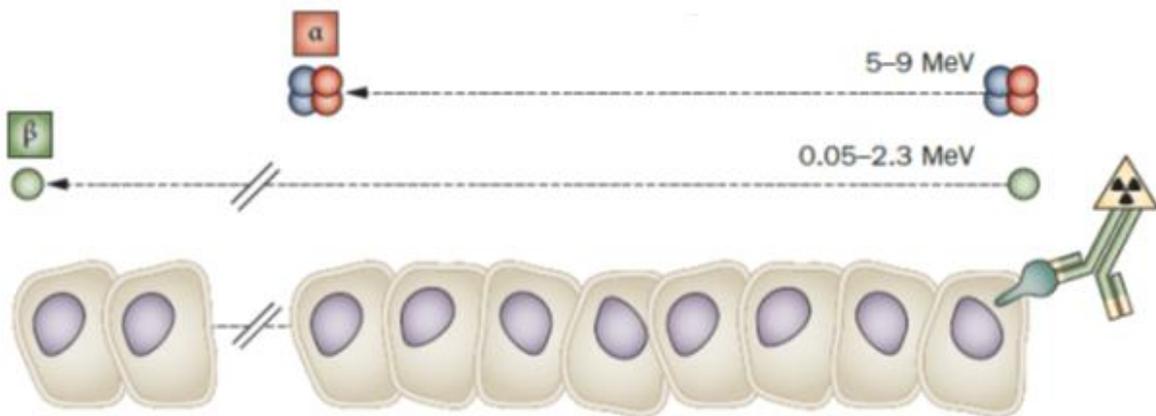


Figura 2.4.3. Alcance de las partículas α y β y relativa al diámetro celular.

2.4.3 Daño al ADN: tipos de rompimientos

En el ADN se han identificado diferentes tipos de daño como: rompimientos de una sola cadena y de doble cadena, daños en las bases nitrogenadas, crosslinks ADN-ADN y ADN-proteína, aberraciones cromosómicas. Estas lesiones al no ser reparadas dan como resultado la muerte celular a través de apoptosis o catástrofe mitótica. Sin embargo, no todas las lesiones sin reparar son letales para la célula, ellas pueden pasar a las células hijas y dar lugar a mutaciones, inestabilidad genómica y eventualmente al desarrollo de cáncer (Hall & Willson, n.d.).

En el caso de rompimiento único de una sola cadena, tienen pocas consecuencias en lo que respecta a la destrucción celular, ya que se reparan fácilmente utilizando la cadena opuesta como modelo. Por otro lado si la reparación de la cadena es incorrecta el resultado podría ser una mutación (Hall & Willson, n.d.). Para el rompimiento de doble cadena es importante analizarlos ya que si la célula no tiene la capacidad para responder adecuadamente a la reparación de DSB, puede conducir a una inestabilidad genómica, que a su vez lleva a la muerte celular o aumentar el riesgo de consecuencias patológicas como el desarrollo del cáncer (Hall & Willson, n.d.).

2.4.4 Hipoxia y Radiación

La radioresistencia tumoral es afectada por la concentración celular de oxígeno, debido a que en diferentes estudios se ha observado que los marcadores de hipoxia aumentan la expresión de genes que están involucrados en la supervivencia de células de cáncer, por ello es importante establecer la relación que tiene la hipoxia con el daño causado al ADN y la supervivencia de las células del glioblastoma al ser expuestas a radiación ionizante (Cepeda Forero et al., 2018).

La hipoxia altera la respuesta a la radioterapia por medio de múltiples moléculas y vías metabólicas que a gran escala afectan el pronóstico del glioblastoma, por otro lado la hipoxia involucra inducción de procesos antioxidantes y de reparación del

ADN que finalmente llevan a la supervivencia celular y mayor radioresistencia. Esta respuesta podría asociarse con la formación de radicales libres de oxígeno, los cuales generan un aumento en el daño al ADN en condiciones de normoxia, pero en ausencia de oxígeno las lesiones por radicales libres son menores debido a la activación de sistemas antioxidantes celulares lo que lleva a una mayor supervivencia celular en condiciones de hipoxia (Cepeda Forero et al., 2018). Las células de glioblastoma tienen mecanismos de reparación del ADN más eficientes en hipoxia, que les permite una mayor tasa de supervivencia celular (Cepeda Forero et al., 2018).

3. Técnicas de evaluación del daño en al ADN

3.1 Ensayo cometa

Existen diferentes técnicas que permiten evaluar el daño al ADN como el ensayo cometa, el cual estima el número de lesiones en la cadena del ADN en células individuales después de la irradiación o aplicación de un tratamiento. Este, en su versión neutra, permite detectar roturas de doble cadena dando lugar a la formación de la cola del cometa donde entre más roturas en el ADN existan mayor será el tamaño de la cola. La principal desventaja de esta técnica es que requiere un muestreo rápido del tumor irradiado debido a la rápida reparación de las roturas de la cadena de ADN (Olive & Banáth, 2006). Una ventaja de utilizar el ensayo cometa es que puede detectar diferencias en el daño y la reparación del ADN a nivel de una sola célula. Esto es principalmente de mucha utilidad para muestras de biopsia de tumores en las que se puede analizar un número relativamente pequeño de células para determinar el daño al ADN (Olive & Banáth, 2006). Para evaluar el daño al ADN se utilizan imágenes de fluorescencia donde se mide la longitud e intensidad de la cola y de la cabeza del cometa y con base en dichas características se estiman los parámetros indicadores del daño al ADN, como por ejemplo: el porcentaje de ADN en la cola, momento de la cola, momento Olive, entre otros (Tabla 3.1).

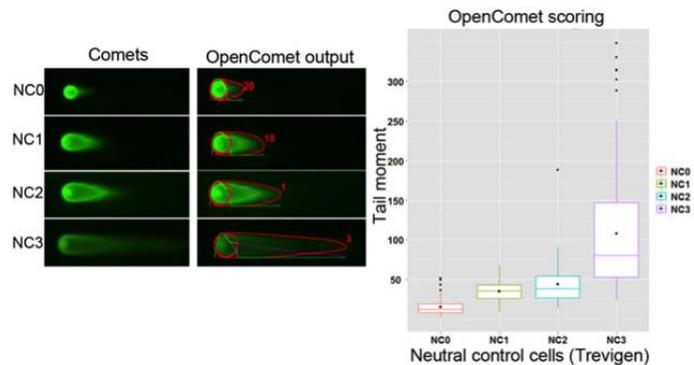


Figura 3.1 Evaluación del daño al ADN utilizando el software Open Comet.

Tabla 3.1 Parámetros del cometa para análisis de daño al ADN

Parámetro	Descripción
Área de cometas	Número de píxeles en el cometa.
Longitud del cometa	Longitud de la región del cometa en píxeles
Contenido de cometa ADN	Suma de intensidades de pixel dentro del cometa.
Intensidad media del cometa	Contenido del ADN del cometa dividido por el tamaño del cometa
Área de la cabeza	Número de píxeles dentro de la cabeza.
Diámetro de la cabeza	Longitud de la cabeza en píxeles.
Contenido de ADN en la cabeza	Suma de intensidades de pixel dentro de la cabeza.
Intensidad media de la cabeza	Contenido de ADN de la cabeza dividido por el tamaño de la cabeza
Cabeza ADN%	Contenido principal de ADN como porcentaje del contenido de ADN del cometa
Área de cola	Número de píxeles en la cola.
Longitud de la cola	Longitud de la cola en píxeles.
Contenido de ADN de cola	Suma de intensidades de pixel dentro de la cola.
Media cola	Contenido del ADN de la cola dividido por el tamaño de la cola
Cola ADN%	Contenido de ADN de la cola como porcentaje del contenido de ADN del cometa
Momento de cola	Longitud de cola veces Cola ADN%
Momento de oliva	% De ADN y la distancia entre los centroides ponderados por intensidad de cabeza y cola

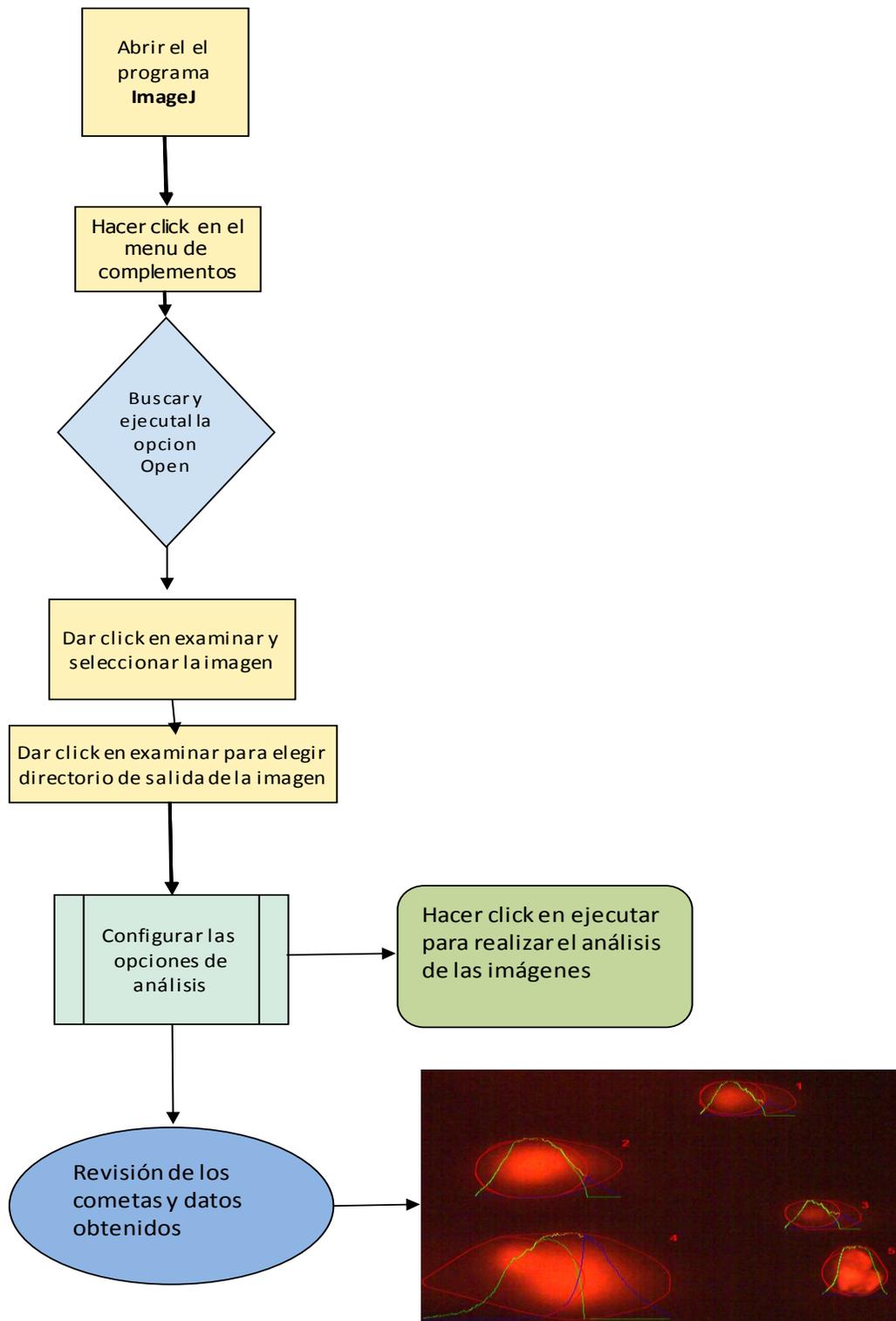


Figura 3.2 Diagrama de flujo para Analisis de Imágenes con el software Open Comet

3.3 Fundamento de la electroforesis

Existen diferentes técnicas que permiten evaluar el daño al ADN, una de ellas es la electroforesis (ensayo cometa), La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico

Esta técnica de separación, que se aplica al análisis de muestras biológicas. Tiene una aplicación al análisis de proteínas y mezclas de fragmentos de ADN. El término electroforesis se refiere al movimiento de una partícula a través de un fluido estacionario bajo la influencia de un campo eléctrico.(Rudge & Monnig, 2000). Cualquier partícula cargada eléctricamente disuelta en solución acuosa, al ser colocada en un campo eléctrico constante, comenzara a emigrar hacia el electrodo que tiene la carga opuesta y la velocidad del movimiento de la partícula será directamente proporcional al voltaje aplicado y a la carga de la partícula, pero inversamente proporcional al tamaño de la partícula (Pláteník, 2008). Un uso importante de esta técnica es medir el daño en el ADN en células individuales ya que es muy versátil y simple de realizar, gracias a esto se pueden medir roturas de una sola hebra, roturas de doble hebra en el ADN, enlaces cruzados y daños en la base.(Olive & Banáth, 2006). Esta técnica se basa en la elución electroforética del ADN de los tapones de agarosa dentro de los cuales se han incrustado y lisado las células irradiadas, permitiendo de esta manera la separación de fragmentos de ADN según el tamaño en el rango de mega base-par, con el supuesto de que los DSB de ADN se inducen al azar, la fracción de ADN liberado del tapón de agarosa es directamente proporcional a la dosis (Olive & Banáth, 2006).

3.4 Microdosimetría

Cuando la radiación ionizante interactúa con la materia, transfiere su energía cinética a los átomos que constituyen dicha materia. El nivel o eficiencia de ionización está relacionada con la trayectoria de la partícula cargada, un ejemplo claro de esto es la eficiencia de ionización y la trayectoria de una partícula β

comparada con el nivel de ionización y trayectoria de una partícula α . Lo que indica que entre más recta sea la trayectoria de la partícula ionizante, más grande será la eficiencia de ionización o su LET (Attix, 2004).

Dependiendo de la distribución microscópica, la energía requerida para un nivel de daño biológico puede variar distintos órdenes de magnitud y esto depende del tipo de radiación ionizante. Entonces, la dosis absorbida (D) es una cantidad útil y estándar en la especificación de la radiación, mientras que los efectos biológicos dependen del patrón con el cual la energía es depositada en el medio irradiado. El conocimiento de la distribución de energía se requiere no solo para explicar los efectos relativos de los diferentes tipos de radiación ionizante si no también para tener una idea de la acción de la radiación ionizante en general, de donde se han construido los principios de la radiobiología.

Al definir la microdosimetría podemos decir que esta es “*El estudio y cuantificación sistemáticos de la distribución espacial y temporal de la energía absorbida en la materia irradiada*”. Cuando un medio es expuesto a campos de radiación ionizante en menos de un microsegundo (μs) en el medio irradiado se producen o inician cambios moleculares y se produce calor (Rossi & Zaider, 1996). En este periodo de tiempo ocurren interacciones altamente complejas las cuales producen moléculas capaces de llevar a cabo una reacción química y estas a su vez producen efectos de detección inmediata (edema) o producen efectos que se detectarían a largo plazo, es decir, después de años o décadas (carcinogénesis). A pesar de estas complejidades, la microdosimetría da la pauta para entender los procesos tempranos que determinan los últimos resultados. Lo anterior es especialmente cierto en el caso de células individuales donde una probabilidad de daño letal requiere un número mínimo de partículas que la atraviesen y la razón de las ionizaciones de la partícula debe ser 1000:1 (Hall & Willson, n.d.).

Si bien es cierto que se requiere un número muy grande de ionizaciones para producir daño letal en una célula debido solamente a la radiación ionizante, no se requieren tantas ionizaciones para desencadenar las reacciones biológicas que son capaces de inducir apoptosis en una célula (Friesen et al., 2003). Lo anterior deja

entre ver que lo importante en este trabajo es conocer la energía impartida en una región de interés. Inicialmente la microdosimetría se basó en el concepto de sitios, los cuales son regiones de dimensiones específicas en las cuales la energía absorbida de la radiación ionizante es importante pero no se considera el cómo es la distribución microscópica en dicha región. Esta aproximación se conoce como *microdosimetría regional*, hoy en día ésta continúa recibiendo mayor atención porque involucra cantidades que pueden ser relacionadas con los efectos de la radiación. Años después se desarrolló otro concepto alternativo más avanzado que se conoce como microdosimetría estructural, el cual fue desarrollado por Kellerer (Delle & Europee, 1970). A diferencia de la microdosimetría regional, la estructural permite una descripción detallada de los patrones microscópicos de la absorción de energía, con lo que se pueden explicar los efectos inmediatos de la radiación mediante la intersección de este patrón y los componentes sensibles de la materia irradiada. La migración de energía entre los puntos de absorción y esas componentes puede ser un factor complicado, sin embargo, se puede colocar dentro de la microdosimetría estructural. Como cualquier otra rama de la física, la microdosimetría tiene parte experimental y teórica. En la primera se miden las cantidades microdosimétricas y la segunda encuentra la relación, si es que existe, entre las cantidades medidas y otras más generales. Puede decirse que ambos niveles, el regional y el estructural son complementarios ya que de la dosimetría regional se pueden obtener medidas experimentales con las cuales se puede dar información a la microdosimetría estructural y viceversa.

La radiación con baja LET (transferencia de energía lineal), crea aproximadamente 1,000 roturas de una sola cadena (SSB) y 40 roturas de doble cadena (DSB) por Gray en una célula típica de mamífero (Ward, 1988). Además, la radiación ionizante causa enormes cantidades de daño a las nucleobases. El nivel de daño de la base se estima en 2,500 a 25,000 Gy⁻¹ cell⁻¹. Además de los daños aislados, se sabe que la radiación ionizante produce múltiples sitios dañados (MDS) que consisten en dos o más daños elementales dentro de unas pocas vueltas helicoidales del ADN. Aquí el término daño elemental significa una rotura de hebra o un daño de base. Las roturas de cadenas aisladas y las roturas de múltiples cadenas en la misma

cadena de ADN en unas pocas vueltas del ADN se detectan como un (SSB) en la mayoría de los ensayos experimentales. Los (DSB) se forman cuando al menos dos roturas de la cadena se forman en la proximidad de las cadenas opuestas del ADN. Los (DSB) y otras clases de MDS pueden ser la causa principal de muerte celular inducida por radiación y mutagénesis (Ward, 2006). La importancia biológica de MDS se atribuye al hecho de que es probable que presenten un desafío especial para los sistemas de reparación de ADN. El conocimiento de la configuración espacial de daños elementales dentro de un MDS es importante. Por ejemplo, los estudios experimentales muestran que el resultado de la reparación depende de los tipos y las posiciones relativas de los daños elementales. La mayoría de las técnicas experimentales utilizadas para detectar daños por radiación en el ADN solo proporcionan información limitada sobre el número exacto y la configuración espacial de los daños elementales dentro de una o dos vueltas del ADN. En cambio, la información detallada sobre el espectro de posibles configuraciones de daño producidas por la radiación ionizante a menudo se obtiene usando simulaciones Monte Carlo en combinación con modelos geométricos del ADN. Si bien es probable que las simulaciones detalladas como estas sigan siendo el "estándar de oro" para predecir el espectro de configuraciones de daños producidos por la radiación, este enfoque es muy costoso desde el punto de vista computacional y puede ser poco práctico para algunas aplicaciones, por ejemplo estimar el rendimiento absoluto de algunas configuraciones de daños poco frecuentes pero posiblemente difíciles de reparar (Holley & Chatterjee, 2006).

3.5 Simulación monte Carlo

El método Monte Carlo (*MC*) consiste en una solución numérica a un problema que modela la interacción de un objeto con otro objeto o la interacción del objeto con su entorno. Representa un intento de modelar la naturaleza a través de simulación directa de la dinámica esencial del sistema en cuestión. Esta técnica es esencialmente simple en su enfoque de una solución a un sistema macroscópico a

través de la simulación de sus interacciones microscópicas. Una solución es determinada por muestreo aleatorio de las relaciones o interacciones microscópicas, hasta que el resultado converge, en medida en que muchas interacciones microscópicas pueden ser modeladas matemáticamente, la solución repetitiva puede ser ejecutada por un ordenador dando paso a una simulación. En algunos casos, las interacciones microscópicas son bien conocidos como por ejemplo las interacciones electromagnéticas de electrones de alta energía y los fotones los cuales pueden verificarse por experimentos (Bielajew, 2001)

En particular esta técnica es considerada como un método preciso para dar solución a problemas de transporte de radiación ionizante y no ionizante, a lo largo de la historia se ha estudiado la simulación del transporte de radiación ionizante en uno o varios medios materiales conformando geometrías distintas de estudio en el área médica es importante saber la interacción de la radiación ionizante con el tejido blando, debido a que estas interacciones dan paso a solución en aplicaciones de diagnóstico, terapia y reconstrucción de imágenes. Con el método Monte Carlo los procesos físicos son simulados teóricamente sin necesidad de resolver completamente ecuaciones de un sistema. Sin embargo, es importante conocer las funciones de densidad de probabilidad que describen el comportamiento del sistema a estudiar. Con el algoritmo de Monte Carlo requerimos generar números aleatorios que sigan una cierta distribución de probabilidad en general uniforme (Del & México, 2017).

Por lo tanto, él *MC* es útil para predecir las trayectorias de las partículas de alta energía a través de detectores y otros conjuntos complejos de materiales, el transporte de partículas es de tipo estocástico (no se puede prever que tipo de interacción se produce a cada momento pero si se le puede asignar una probabilidad a cada uno de ellos), para el caso de la interacción de la radiación con la materia descritas por el efecto Compton, Fotoeléctrico, Rayleigh y Producción de Pares; las distribuciones de probabilidad son conocidas y el método Monte Carlo

aplicado a la simulación modela cada uno de los posibles sucesos (Del & México, 2017)

3.6 Código MCDS

En contraste con la radiación ionizante, por ejemplo, los procesos endógenos crean principalmente sitios de daño aislados. El esquema de Monte Carlo propuesto en código MCDS proporciona un algoritmo simple y rápido para simular la formación de sitios de ADN dañados de forma individual y múltiple, incluida varias clases de SSB y DSB. El éxito de este algoritmo indica que los efectos de agrupamiento de daños a pequeña escala pueden simularse sin considerar explícitamente la estructura del ADN, el plegamiento de orden superior de la cromatina o la distribución espacial de los depósitos de energía creados a lo largo de una pista de radiación. Esta observación es consistente con la hipótesis de que los procesos físicos y químicos responsables de crear grupos locales de daños elementales (lesiones) se inician principalmente por depósitos de energía creados dentro de unos pocos nanómetros del ADN (Brenner & Ward, 1992). Sin embargo, incluso en estas regiones de tamaño nanométrico, diferentes tipos de radiación producen distribuciones espaciales de depósitos de energía ligeramente diferentes.

Aunque el algoritmo de Monte Carlo propuesto reproduce con éxito muchos de los efectos de agrupamiento de daños a pequeña escala predichos por los códigos de estructura de la pista, el algoritmo no proporciona información sobre dónde están ubicadas las lesiones dentro del ADN de una célula. Para imitar la distribución espacial de las lesiones esperadas en un cromosoma o célula específica, se debe especificar un algoritmo de colocación de la lesión. Por ejemplo, las lesiones generadas utilizando el esquema de Monte Carlo propuesto podrían colocarse en ubicaciones aleatorias en el ADN. Para radiación de baja LET, la distribución aleatoria de lesiones dentro del ADN de una célula es bastante razonable. Como primera aproximación, la colocación aleatoria de lesiones dentro del ADN también podría usarse para radiación de alta LET. Sin embargo, la radiación LET alta

produce distribuciones de ruptura no aleatorias, lo que implica que la distribución de todas las clases de lesiones también puede ser no aleatoria. Para imitar la distribución espacial no aleatoria de las lesiones producidas por la radiación LET alta, lo más probable es que se requiera la formulación de un esquema de Monte Carlo de nivel superior que tenga en cuenta la organización y estructura de la cromatina, así como la estructura general de la trayectoria de la radiación.

El algoritmo propuesto se basa en esta relación lineal. Implícitamente en generación de daños es decir los espectros de los daños producidos no cambian con la dosis absorbida y los rendimientos de SSB y DSB por célula aumentan en proporción directa a la dosis absorbida. Para las células de mamíferos con un contenido de ADN de aproximadamente 6.000 Mbp por célula, el número inicial de DSB por célula aumenta linealmente con el aumento de la dosis hasta al menos 50 Gy. Para las células de mamíferos, el algoritmo de generación de daños de Monte Carlo propuesto es, por lo tanto, válido hasta dosis de al menos unos pocos Grays (Frankenberg-Schwager, Frankenberg, Blöcher, Adamczyk, & Blocher, 2006).

Si bien el algoritmo propuesto reproduce las tendencias generales en el espectro de daños del ADN predicho mediante simulaciones de estructura de trayectoria (Nikjoo, O'Neill, Terrissol, & Goodhead, 1999), quedan preguntas sobre la disposición espacial de los daños elementales dentro de una o dos vueltas del ADN. Ward (Milligan, n.d.) estimaron que, en el caso de la radiación de bajo LET, los daños elementales dentro de un MDS pueden estar separados hasta 30 pb. Teniendo en cuenta la periodicidad del nucleosoma, son posibles MDS de hasta 80 pb de longitud.

3.7 Glioma Humano

El glioblastoma (GBM) es un tumor cerebral maligno, con una supervivencia global media de quince meses. El GBM es la forma más frecuente y maligna de tumor cerebral primario ya que es incurable y su resistencia a la terapia se atribuye a una subpoblación de células llamadas células madre de glioma (LINHARES et al., 2017).

Su capacidad para infiltrarse rápidamente en el parénquima cerebral circundante contribuye a su patogenicidad y resistencia a las terapias convencionales. El glioma se desarrolla como resultado de la acumulación gradual de múltiples alteraciones genéticas, que dan como resultado la activación de los oncogenes y la inactivación de los genes supresores de tumores (LINHARES et al., 2017).

El tratamiento actual para GBM incluye una combinación de cirugía de reducción de volumen cuando sea posible con quimioterapia y radioterapia. Incluso con este régimen multimodal, el pronóstico para los pacientes con GBM sigue siendo malo, con una supervivencia media de solo 12 a 15 meses (Clínicas, 2015).

4. METODOLOGIA

4.1 Cultivo Celular e Inducción De Hipoxia.

Se cultivaron células de cáncer de glioma humano U87MG (obtenidas de ATCC, EE. UU.) A 37 ° C con 5% de CO₂ y 85% de humedad en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de antibióticos (estreptomomicina y penicilina). Las suspensiones celulares se prepararon con una concentración final de 6,5 x10⁴ células / tubo (80 cel / μl) y se incubaron en condiciones estándar (5% de CO₂, 37 ° C).

La hipoxia se indujo con CoCl_2 , que es un agente mimético que se usa in vitro para estabilizar el HIF-1 α e inducir respuestas celulares mediadas por la hipoxia (López-Sánchez et al., 2014). Se prepararon soluciones stock de cloruro de cobalto 5 mM ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y se agregaron a la suspensión celular para obtener una concentración de 300 μM . Las suspensiones celulares con CoCl_2 se incubaron durante 18 h en condiciones estándar para inducir hipoxia.

4.2 Calculo Experimental por Ensayo Cometa de DSB

Para medir el daño en el ADN inducido por Iodo-131 y estimar las roturas de doble cadena del ADN, se realizó un ensayo de cometa neutro (Olive y Banáth, 2006). Se usó una muestra de suspensión celular con 20, 000 células y se mezcló con agarosa de baja temperatura de gelificación (sigma Aldrich, Tipo IV). La mezcla se añadió a un portaobjetos previamente revestido de agarosa. Una vez que la agarosa se gelificó, los portaobjetos se sumergieron en una solución de lisis neutra durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la lisis, los portaobjetos se retiraron y se sumergieron en una solución de electroforesis neutra durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de eso, se realizó una electroforesis neutra durante 45 minutos a 80 V y 44 mA. Las muestras se neutralizaron con agua destilada y se tiñeron con solución de bromuro de etidio (10 μl / ml) durante 20 min. Las muestras se visualizaron mediante microscopía de epifluorescencia y se analizaron con un software de ensayo de cometas abierto (<http://www.cometbio.org/>). El % de ADN en cola se usó para cuantificar la extensión del daño del ADN por exposición al I-131 en condiciones de hipoxia vs normoxia a un tiempo de 4h. Como referencia y dado que el Lu-177 también se utiliza en terapia se compararon los resultados con I-131.



*Figura 4.2 Procedimiento para obtener las imágenes de los cometas.
es.slideshare.net (2009)*

4.3 Cálculo del espectro de energía de electrones secundarios del I-131

Para obtener el espectro de los electrones del I-131, se realizó la simulación con el código MCPTmx con 1×10^9 historias (fotones lanzados) con una energía inicial de 364 Kev. Para obtener el espectro se utilizó la siguiente geometría: Una barra cilíndrica de agua de dos milímetros de espesor es decir un cilindro aplastado de 7.52 cm de diámetro y 2 mm de altura, la fuente puntual se encuentra en el centro radial y longitudinal. Los datos obtenidos se utilizaron para crear el archivo DAT necesario para el código MCDS. Se utilizó la técnica evento por evento para seguir al fotón y a cada una de sus interacciones con el medio y así obtener información sobre los fotones que tuvieron dispersión por efecto compton, la energía del electrón fue igual a la energía cinética del fotón menos su energía por dispersión compton. Mediante 100 intervalos de energía, es decir electrones con energía

cinética igual a 0 y menores a 3.64 Kev en el primer intervalo, de 3.64 Kev a energías menores a 7.28 Kev y así sucesivamente hasta llegar al intervalo de 360.36 Kev a 364 Kev. Cada intervalo de energía tiene una diferencia en sus límites de 3.64 Kev.

Una vez obtenidas las frecuencias de electrones en cada intervalo de energía se graficó en Origin Pro 8.

4.4 Cálculo por Monte Carlo de SSB y DSB

El algoritmo para simular daños en el ADN está descrito a detalle en (Semenenko y Stewart, 2004) y el código de simulación Monte Carlo (MCDS) para calcular el daño al ADN cuantificando los SSB y DSB se obtuvo de <http://faculty.washington.edu/trawets/mcnds/>. Para la simulación, se consideró el espectro beta y los electrones liberados por los fotones emitidos por el Iodo-131 (^{131}I), el haz será colocado incidente en la parte inferior de la placa de cultivo celular. El código MCDS simuló la inducción de lesiones de ADN con concentraciones de 0 a 100% de oxígeno. Sin embargo, alrededor del 20% se consideran condiciones normóxicas, en este trabajo se utilizaron concentraciones de O_2 del 0.01, 0.1, 1, 10 y 20%. Para la simulación, también se consideró las características de las células U87MG como el radio nuclear y del citoplasma (5 y 10 μm respectivamente) y 100,000 células. El número de SSB y DSB se obtuvieron para una dosis absorbida de 1 Gy por célula, el segmento de ADN considerado está compuesto por 1×10^9 pares de bases (Gbp) dentro del núcleo celular. (Stewart et al., 2011)

5. Resultados y Análisis

5.1 Resultados Experimentales

5.1.1 Ensayo Cometa

En la figura 5.1.1 y 5.1.2 muestran el porcentaje de daño al ADN, que corresponde a la presencia de DSB, en células U87MG en condiciones de hipoxia y normoxia producido por I-131 y Lu-177 respectivamente, evaluados por ensayo cometa. El daño al ADN en las células U87MG en condiciones de normoxia inducido por el I-131 fue 37% mayor en comparación con las condiciones de hipoxia, a un tiempo de exposición de 4 h (figura 5.1.1). Mientras que, el daño al ADN inducido por el Lu-177 en las células U87MG en condiciones de normoxia fue 30% mayor que las condiciones hipóxicas.

Cómo se esperaba las condiciones de hipoxia indujeron menor daño al ADN en comparación con las condiciones de normoxia, esto se debe a que en bajas concentraciones de oxígeno existe menor probabilidad de que la radiación ionizante interactúe por acción indirecta, reduciendo la presencia de radicales libres los cuales son los principales causantes de daño en el ADN (Begg et al., 2011; Stewart et al., 2011).

Al comparar los resultados obtenidos con I-131 y Lu-177 se observa que el porcentaje de daño al ADN inducido por el I-131 es mayor en comparación con el Lu-177, lo cual se relaciona con las características físicas de emisión de dichos radionúclidos (Yeong, Cheng, & Ng, 2014), ya que el I-131 emite partículas β con energía de 606 keV con probabilidad de emisión 81.7 % mientras que el Lu-177 emite partículas β con energía de 498 keV con probabilidad de emisión del 98% (Yeong et al., 2014), lo cual contribuye a una diferencia entre la dosis absorbida impartida por célula, siendo la dosis absorbida para el I-131 de 16.19 Gy/cel y para el Lu-177 de 13.29 Gy/cel.

El ensayo cometa reafirma que las células U87MG son resistentes al I-131 y Lu-177 en condiciones de hipoxia. Estos resultados concuerdan con estudios previamente reportados (Koosha, 2015) (Azorín-Vega, Aranda-Lara, Torres-García, & Santiago-Bañuelos, 2019). Además, dichos estudios sugieren que las células de glioblastoma tienen mecanismos de reparación del ADN más eficientes en hipoxia, que les permiten una mayor tasa de supervivencia celular (Azorín-Vega et al., 2019). Henry et al (2016) menciona una mayor actividad de reparación podría asociarse al aumento en la expresión de proteínas como la Osteopontina (Henry et al., 2016). (Vartanian et al., 2014).

La hipoxia altera la respuesta a la radioterapia por medio de múltiples moléculas y vías metabólicas que, a gran escala, afectan el pronóstico del glioblastoma (Huang, Chen, & Zhang, 2016). En condiciones de normoxia, la radioterapia afecta al ADN de manera directa o por medio de especies reactivas de oxígeno, Manoochehri et al., (2016) explica que al reducir las concentraciones de oxígeno se altera la producción de radicales libres y se activa el factor de inducción de hipoxia (HIF-1 α) (Manoochehri Khoshinani, Afshar, & Najafi, 2016), complejo proteico que incrementa la expresión de genes específicos en presencia de bajas concentraciones de oxígeno, que induce procesos antioxidantes y de reparación del ADN, que finalmente llevan a la supervivencia celular y mayor radioresistencia (Manoochehri Khoshinani et al., 2016).

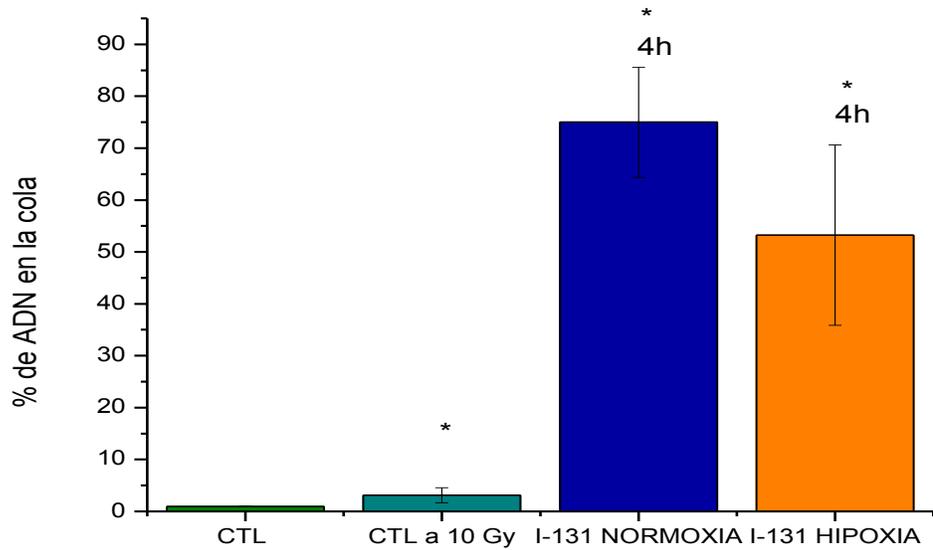


Figura 5.1.1 Porcentaje de daño al ADN en células U87 en condiciones de hipoxia y normoxia inducido por I-131 a un tiempo de exposición de 4h.

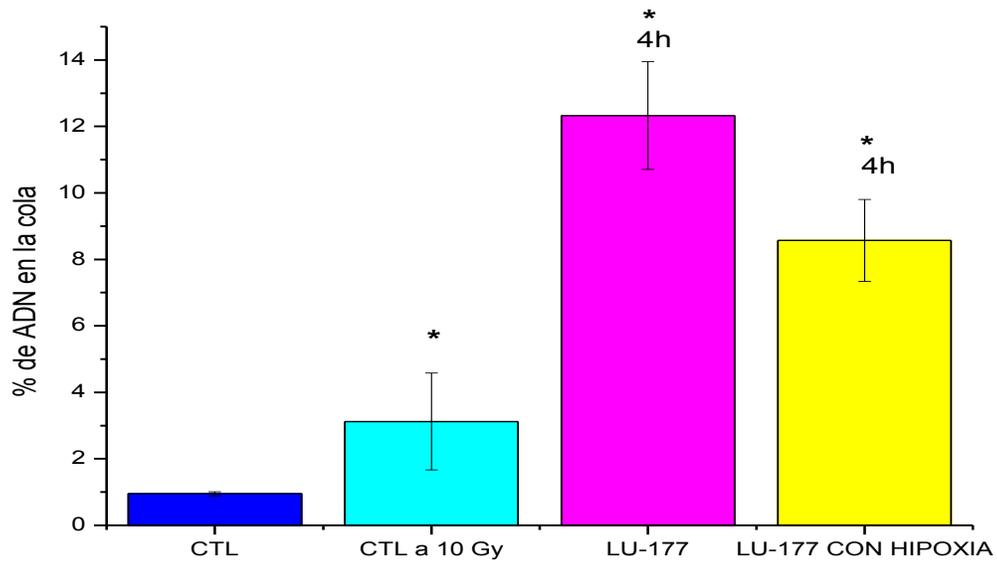


Figura 5.1.2 Porcentaje de daño al ADN en condiciones de hipoxia y normoxia LU-177 a un tiempo de exposición de 4h.

5.2 Resultados de Simulación

5.2.1 Espectro de electrones secundarios

El espectro de energía de los electrones liberados por los fotones del 1-131, cuyas energías son 364, 637, y 723 keV se muestra en la figura 5.2.1, dicho espectro se obtuvo desarrollando una subrutina implementada en el código MCPTmx (Díaz-Díaz, Torres-García, Oros-Pantoja, Lara, & Vieyra-Reyes, 2018), para realizar el transporte de fotones y determinar la cantidad y energía de electrones liberados en agua por los fotones mencionados.

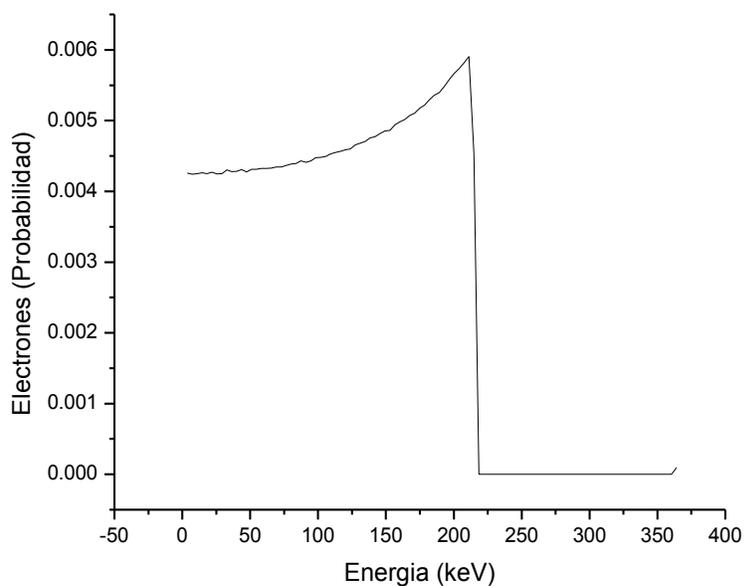


Figura 5.2.1 Espectro de energía de los electrones secundarios del 1-131

5.2.2 Espectro beta

Dado que el I-131 es un radionúclido emisor beta menos, el espectro beta se obtuvo la base de datos de Doseinfo-Radar (<http://www.doseinfo-radar.com>) del archivo Beta Spec, mostrado en la figura 5.2.2 y se utilizó para crear el archivo de entrada tipo .DAT del código MCDS.

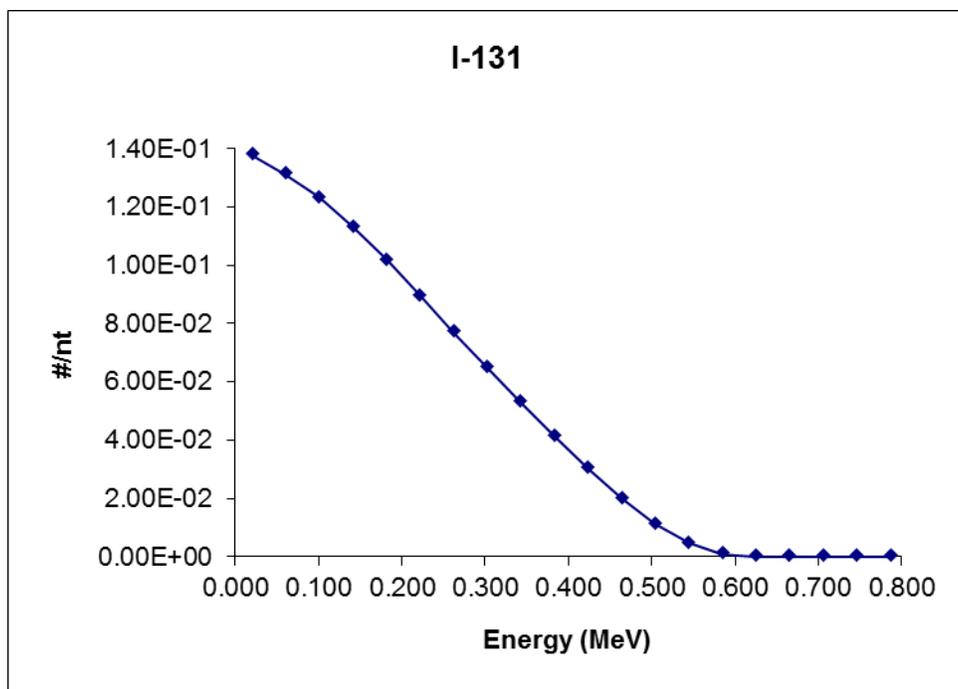


Figura 5.2.2 Espectro Beta del I-131. BetaSpec F3.xls

5.2.3 Daño al ADN SSB Y DSB

Los resultados de simulación del código MCDS se muestran en la Tabla 1 donde se observa el porcentaje de diferentes clases de daños inducidos en el ADN por electrones, tales como DSB, SSB, DSB+, DSB++, 2SSB, etc. Se observa mayor presencia de SSB y DSB cuando existe una mayor concentración de oxígeno. Se obtuvieron simulaciones con el archivo .DAT obtenido con el espectro de electrones liberados por los fotones del I-131 y con el archivo .DAT obtenido del espectro beta y al final se sumaron los daños obtenidos en las simulaciones con los dos espectros

de energía. Debido a que el código MCDS está diseñado para simular daños en el ADN para 1 Gpb los resultados se multiplicaron por 6 para obtener una simulación para 6 Gpb que corresponde al contenido de una célula humana. Cabe destacar que la concentración de oxígeno del 20% o mayor representa condiciones de normoxia.

Tabla 1. Porcentaje de diferentes tipos de daños en el ADN obtenidos con el código MCDS a diferentes concentraciones de oxígeno.

<i>Concentración de Oxígeno de 0.01%</i>		<i>Concentración de Oxígeno de 0.1%</i>		<i>Concentración de Oxígeno de 1%</i>	
% DAÑO PRODUCIDO	TIPO DE DAÑO	% DAÑO PRODUCIDO	TIPO DE DAÑO	% DAÑO PRODUCIDO	TIPO DE DAÑO
855.066	BD	850.44	BD	833.31	BD
327.708	SSB	330.354	SSB	339.57	SSB
8.16	SSB+	9.09	SSB+	12.702	SSB+
0.612	2SSB	0.732	2SSB	1.344	2SSB
7.794	DSB	8.616	DSB	11.628	DSB
0.594	DSB+	0.72	DSB+	1.314	DSB+
0.036	DSB++	0.048	DSB++	0.126	DSB++
31.266	SSBc	34.65	SSBc	47.67	SSBc
316.29	SSBcb	341.214	SSBcb	428.328	SSBcb
89.826	DSBc	98.226	DSBc	132.402	DSBc
412.014	DSBcb	443.43	DSBcb	547.932	DSBcb

Concentración de Oxígeno de 10%

Concentración de Oxígeno de 20%

% DAÑO PRODICIDO	TIPO DE DAÑO	% DAÑO PRODICIDO	TIPO DE DAÑO
822.078	BD	821.088	BD
345.216	SSB	345.696	SSB
15.21	SSB+	15.444	SSB+
1.854	2SSB	1.908	2SSB
13.62	DSB	13.778	DSB
1.818	DSB+	1.866	DSB+
0.204	DSB++	0.216	DSB++
56.532	SSBc	57.336	SSBc
479.76	SSBcb	484.02	SSBcb
155.304	DSBc	157.302	DSBc
608.736	DSBcb	613.542	DSBcb

BD: Uno o más daños en la base (sin Sb), **(SSB)**, **(SSB+):** dos Sb en la misma hebra, **(2SSB):** dos o más Sb en cadenas opuestas separadas por al menos 10 pares de bases, **(DSB)**, **(DSB+):** DSB acompañado de uno (o más) Sb adicional dentro de una separación de 10 pares de bases, **(DSB++):** más de un DSB, ya sea dentro de la separación de 10 pares de bases o más separados, **(SSBc):** fracción de daño complejo (SSB+ y 2SSB), **(SSBcb):** fracción de daño complejo (SSB+ y 2SSB); daño de base incluido, **(DSBc):** fracción de daño complejo (DSB+ y DSB ++), **(DSBcb):** fracción de daño complejo (DSB+ y DSB ++); daño de base incluido.

Se observa que el daño de base aumenta sustancialmente la proporción de SSB y DSB. Este comportamiento se observó con los datos obtenidos en las diferentes concentraciones de oxígeno. De acuerdo con la salida MCDS, la cantidad de DSBcb (DSB complejo que incluye daños base) es 3 veces mayor que DSBc, y la cantidad de SSBCb es 8 veces mayor que SSBC. Dado que SSBC y DSBc, demuestran resultados más realistas y detallados de los daños en los sitios afectados del ADN, son más comparables a los resultados experimentales del ensayo Open Comet (Koosha, 2015).

En la tabla 2 se muestran los daños inducidos en el ADN por electrones, tales como DSB, SSB, DSB+, DSB++, 2SSB con una concentración de oxígeno de 100%

Tabla 2. Porcentaje de daño producido al ADN con una concentración de oxígeno de 100%

% DAÑO PRODUCIDO	TIPO DE DAÑO
819.816	BD
346.17	SSB
15.636	SSB+
1.95	2SSB
13.95	DSB
1.908	DSB+
0.222	DSB++
58.008	SSBc
487.512	SSBcb
158.904	DSBc
617.67	DSBcb

Al comparar los resultados de la tabla 2 con los resultados de la tabla 1, se observa que en efecto en las simulaciones que se realizaron con concentraciones de oxígeno de 0.01%, 0.1%, y 1%, la presencia de SSB y DSB son hasta un 45% menor que los resultados obtenidos con la simulación con una concentración de 100% de oxígeno pero al comparar los resultados de las simulaciones de 10% y 20% de oxígeno, se observó que la presencia de SSB y DSB no tiene diferencias significativas en comparación con los resultados obtenidos en la simulación de concentración de oxígeno de 100%, esto podría asociarse a que con una concentración de oxígeno de 20% aún se consideran condiciones normoxicas y por ello no se observan diferencias entre los datos obtenidos entre las simulaciones.

Por otro lado, el porcentaje de SSB y DSB depende del tipo de radionúclido que se utilice, así como de la geometría que se use para obtener los espectros de energía de los electrones secundarios, del número de células, número de historias y del número de Gpb.

6. Conclusiones

El ensayo cometa mostró que las emisiones beta y gamma del I-131 producen DSB en el ADN en células U87MG en condiciones de normoxia e hipoxia.

La Simulación Monte Carlo muestra un resultado más detallado sobre el porcentaje de DSB en el ADN producido por el ^{131}I con diferentes concentraciones de oxígeno.

Se mostró que es más citotóxico el ^{131}I que el ^{177}Lu , lo cual se asocia a las diferencias físicas de sus emisiones ionizantes.

En ambos casos, el experimento y la simulación Monte Carlo concuerdan y muestran la radiotoxicidad del ^{131}I en células de glioblastoma humano mostrando el potencial terapéutico *In Vitro* que tiene el ^{131}I para tratamiento del glioblastoma humano.

7. Referencias

Muhammad, W. (2018). Radioactive iodine therapy for hyperthyroidism : Physics, treatment protocols and radiation protection, (April).

Alpha decay. (n.d.), 2–5.

Alpha decay. (n.d.), 2–5.

America, R. S. of N. (2013). Terapia de yodo radioactivo (I -131) para hipertiroidismo, *131*, 1–4.

Begg, A. C., Stewart, F. A., & Vens, C. (2011). Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nature Reviews Cancer*, *11*(4), 239–253. <https://doi.org/10.1038/nrc3007>

Brenner, D. J., & Ward, J. F. (1992). Constraints on energy deposition and target size of multiply damaged sites associated with DNA double-Strand breaks. *International Journal of Radiation Biology*, *61*(6), 737–748. <https://doi.org/10.1080/09553009214551591>

Calderón, E. L. (2010). *Aplicaciones de la Simulacion Monte Carlo en Dosimetria y Problemas de Fisica Medica*.

Cepeda Forero, K., Langer Barrera, M., Mosquera Paternina, A., Montoya Vega, C., Riveros Calvete, P., Mendoza Guerra, A.,... Ondo Méndez, A. (2018). Radioresistencia en glioblastoma: papel de la hipoxia en la genotoxicidad tumoral inducida por radiaciones ionizantes. *Ciencia e Investigación Medico Estudiantil Latinoamericana*, *23*(1), 19–26. <https://doi.org/10.23961/cimel.v23i1.1066>

Cepeda Forero, K., Langer Barrera, M., Mosquera Paternina, A., Montoya Vega, C., Riveros Calvete, P., Mendoza Guerra, A., ... Ondo Méndez, A. (2018). Radioresistencia en glioblastoma: papel de la hipoxia en la genotoxicidad tumoral inducida por radiaciones ionizantes. *Ciencia e Investigación Medico Estudiantil Latinoamericana*, *23*(1), 19–26. <https://doi.org/10.23961/cimel.v23i1.1066>

- Cherry, R., Upton, A., Lodde, G., & Porter, S. (2010). Radiaciones ionizantes 48. *Enciclopedia de Salud y Seguridad En El Trabajo*, 46. <https://doi.org/NIPO201-01-029-5>
- Clínicas, S. U. S. I. (2015). Artículo de Revisión GLIOBLASTOMA: ANÁLISIS MOLECULAR Y GLIOBLASTOMA: MOLECULAR ANALYSIS AND ITS CLINICAL, 32(2), 7–10.
- Delle, C., & Europee, C. (1970). SECOND SYMPOSIUM ON MICRODOSIMETRY, (January).
- Díaz-Díaz, J. A., Torres-García, E., Oros-Pantoja, R., Lara, L. A., & Vieyra-Reyes, P. (2018). New track-structure Monte Carlo code for 4D ionizing photon transport. *Radiation Effects and Defects in Solids*, 173(7–8), 567–577. <https://doi.org/10.1080/10420150.2018.1484744>
- Drinking, A. N., Clearinghouse, W., & Sheet, F. (n.d.). Radionuclides.
- Frankenberg-Schwager, M., Frankenberg, D., Blöcher, D., Adamczyk, C., & Blocher, D. (2006). Effect of Dose Rate on the Induction of DNA Double-Strand Breaks in Eucaryotic Cells. *Radiation Research*, 87(3), 710. <https://doi.org/10.2307/3575532>
- Friesen, C., Lubatschowski, A., Kotzerke, J., Buchmann, I., Reske, S. N., & Debatin, K. M. (2003). Beta-irradiation used for systemic radioimmunotherapy induces apoptosis and activates apoptosis pathways in leukaemia cells. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 30(9), 1251–1261. <https://doi.org/10.1007/s00259-003-1216-z>
- Gang, W., Wang, J.J., Fu, X.L., Rui, G., Tony To, S.S., 2017. Advances in the targeting of HIF-1 α and future therapeutic strategies for glioblastoma multiforme (Review). *Oncol. Rep.* 37, 657–670. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5309>
- Holley, W. R., & Chatterjee, A. (2006). Clusters of DNA Damage Induced by Ionizing Radiation: Formation of Short DNA Fragments. I. Theoretical Modeling. *Radiation Research*, 145(2), 188. <https://doi.org/10.2307/3579174>
- Huang, W. J., Chen, W. W., & Zhang, X. (2016). Glioblastoma multiforme: Effect of hypoxia and hypoxia inducible factors on therapeutic approaches (review). *Oncology Letters*, 12(4), 2283–2288. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4952>
- Jawhari, S., Ratinaud, M.H., Verdier, M., 2016. Glioblastoma, hypoxia and autophagy: A survival-prone “ménage-à-trois.” *Cell Death Dis.* 7. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.318>

- Know, D. Y., & Rutherford, E. (2015). Lesson 43 : Alpha , Beta , & Gamma Decay, 1–8.
- Koosha, F. (2015). DNA damage induced in glioblastoma cells by i-131: A comparison between experimental data and monte carlo simulation. *IFMBE Proceedings*, 51(June), 1717–1722. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19387-8_417
- La CELULA quinta edición, H., Cooper, G. M., Hausman, R. E., Estigma del VaPorEso Los autores Geoffrey Cooper es Profesor Jefe, E. M., Hausman es Profesor Director, R. E., Wright, D. N., & Estigma del VaPorEso Contenido, E. (n.d.). *Edición en español de: The Cell: a Molecular Approach, 5th edition*. Retrieved from <http://mgl.scripps.edu/people/goodsell>
- Lacoeuille, F., Arlicot, N., Faivre-Chauvet, A., 2018. Targeted alpha and beta radiotherapy: An overview of radiopharmaceutical and clinical aspects. *Médecine Nucléaire* 42, 32–44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2017.12.002>
- Manoochehri Khoshinani, H., Afshar, S., & Najafi, R. (2016). Hypoxia: A Double-Edged Sword in Cancer Therapy. *Cancer Investigation*, 34(10), 536–545. <https://doi.org/10.1080/07357907.2016.1245317>
- Murray, R. L., & Holbert, K. E. (2015). Chapter 3 - Radioactivity. *Nuclear Energy (Seventh Edition)*, 31–46. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416654-7.00003-4>
- Nikjoo, H., O'Neill, P., Terrissol, M., & Goodhead, D. T. (1999). Quantitative modelling of DNA damage using Monte Carlo track structure method. *Radiation and Environmental Biophysics*, 38(1), 31–38. <https://doi.org/10.1007/s004110050135>
- Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23–29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>
- Powsner, R. A. (n.d.). *Essential Nuclear Medicine Physics*.
- Radionuclides _ Radiation Protection _ US EPA. (n.d.).
- Roentgen, W. C., Personal, R., Trabajadores, D., & Para, N. (2016). Introducción a la terapia para el cáncer (radioterapia), 1–4.
- Rojas, E. (2010). Aplicaciones de la simulación Monte Carlo en dosimetría y problemas de física médica. *Contribuciones Del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares Al Avance de La Ciencia y La Tecnología En México*, 89–105.

- Rossi, H. H., & Zaider, M. (1996). Microdosimetry and Its Applications. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*, 49(0), 6221. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-85184-1>
- Rudge, S. R., & Monnig, C. A. (2000). Electrophoresis techniques. *Separation and Purification Methods*, 29(1), 129–148. <https://doi.org/10.1081/SPM-100100006>
- Rules, S., & Decay, B. (n.d.). 7. Radioactive decay, 93–105.
- Scott, S. P., & Pandita, T. K. (2006). The cellular control of DNA double-strand breaks. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(6), 1463–1475. <https://doi.org/10.1002/jcb.21067>
- Stewart, R. D., Yu, V. K., Georgakilas, A. G., Koumenis, C., Park, J. H., & Carlson, D. J. (2011). Effects of Radiation Quality and Oxygen on Clustered DNA Lesions and Cell Death. *Radiation Research*, 176(5), 587–602. <https://doi.org/10.1667/RR2663.1>
- Ward, J. F. (1988). DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 35(C), 95–125. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60611-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60611-X)
- Ward, J. F. (2006). Radiation Mutagenesis: The Initial DNA Lesions Responsible. *Radiation Research*, 142(3), 362. <https://doi.org/10.2307/3579145>
- Wei, J., Wu, A., Kong, L.Y., Wang, Y., Fuller, G., Fokt, I., Melillo, G., Priebe, W., Heimberger, A.B., 2011. Hypoxia potentiates glioma-mediated immunosuppression. *PLoS One* 6, e16195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016195>
- Wu, D., & Yotnda, P. (2011). Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture 2 . Hypoxia induced in Modular Incubator Chamber, (August), 2–5. <https://doi.org/10.3791/2899>
- Xie, Y., Bergström, T., Jiang, Y., Johansson, P., Marinescu, V. D., Lindberg, N., ... Uhrbom, L. (2015). The Human Glioblastoma Cell Culture Resource: Validated Cell Models Representing All Molecular Subtypes. *EBioMedicine*, 2(10), 1351–1363. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.08.026>

