



**Universidad Autónoma del Estado de México
Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares**

Facultad de Medicina

**Departamento de Estudios de Posgrado
Maestría en Ciencias con Especialidad
en Física Médica**

**EVALUACIÓN DE LA RADIOSENSIBILIZACIÓN DE LEUCOCITOS,
NORMOBLASTOS Y CÉLULAS DE LA MÉDULA ÓSEA MEDIANTE
LA INCORPORACIÓN DE BROMODESOXIURIDINA, EN UN
MODELO MURINO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN FÍSICA MÉDICA**

P R E S E N T A

I.Q. Marcela Angélica Ávila Sánchez

Tutor Académico Dr. en C. Pedro Rosendo Morales Ramírez

**Revisores Dr. en C. Alberto Ernesto Hardy Pérez
 M. en C. Eleni Mitsoura
 Dr. en C. Eugenio Torres García
 Dr. en I.C. Rigoberto Oros Pantoja
 Dra. en C. Keila Isaac Olivé
 Dr. en C. Miguel Ángel Camacho López**

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida.

RESUMEN

La BrdU, es un nucleótido sintético análogo a la timidina que actúa como radiosensibilizador alterando la estabilidad del ADN, inhibiendo la reparación de roturas en el ADN causadas por la radiación. El indagar las condiciones en las que se pueda optimizar la inducción de radiosensibilización por acción de la BrdU, específicamente sobre normoblastos, leucocitos y células de la médula ósea, pudiera optimizar las estrategias de ablación de médula ósea mediante radioterapia.

Se evaluó *in vivo* el efecto radiosensibilizador de la BrdU en las tres líneas celulares antes citadas, teniendo como objeto de estudio a ratones machos de la cepa Balb/c del bioterio del laboratorio de radiobiología celular del ININ. Los leucocitos de sangre periférica fueron estimulados con Filgrastim a una dosis de 18 µg y BrdU a dosis de 0.20, 0.25, 0.32, 0.63, 1.25 y 1.5 mg/g de peso corporal y se tiñeron las células con Hoeschst 33258 y con un anticuerpo monoclonal fluorescente. Para cuantificar los daños genotóxico y citotóxico causados por la incorporación de la BrdU en eritrocitos, se trataron ratones con dosis de 0.50, 0.25 o 0.125 mg de BrdU por gramo de peso corporal y 0.5 Gy de radiación gamma, empleando el ensayo de micronúcleos. Por otro lado, células de la médula ósea fueron tratadas de la siguiente manera: a) 0.125 mg de BrdU por g de peso corporal; b) 0.5 Gy de radiación gamma; c) combinación de ambos agentes. El daño al ADN para los leucocitos y células de la médula ósea, se determinó mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel.

Debido a la toxicidad de la BrdU, no fue posible determinar su incorporación en leucocitos de sangre periférica, pese a que fueron bien estimuladas con Filgrastim. En el caso de los normoblastos, se determinó la frecuencia de eritrocitos policromáticos y se observó un efecto citotóxico sinérgico entre la BrdU y la radiación. Para el análisis de genotoxicidad se determinó la frecuencia de micronúcleos pero no fue posible realizar un análisis apropiado, debido a que la BrdU bloqueó la división celular y no permitió visualizar micronúcleos. Se evidenció el efecto sinérgico de dosis pequeñas de BrdU sobre el efecto citotóxico de la radiación gamma, en el ADN de células de la médula ósea.

ABSTRACT

BrdU is a synthetic nucleotide analogue to thymidine that acts as a radiosensitizer, altering the stability of DNA, inhibiting the repair of breaks in DNA caused by radiation. The investigation of the conditions in which the induction of radiosensitization by BrdU could be optimized, specifically on normoblasts, leukocytes and bone marrow cells, could optimize bone marrow ablation strategies by means of radiotherapy.

The radiosensitizing effect of BrdU in the three aforementioned cell lines was evaluated *in vivo*, with male mice from the Balb/c strain of the ININ biotechnology laboratory of the cellular radiobiology laboratory. Peripheral blood leukocytes were stimulated with Filgrastim at a dose of 18 µg and BrdU at doses of 0.20, 0.25, 0.32, 0.63, 1.25 and 1.5 mg / g body weight and the cells were stained with Hoeschst 33258 and with a monoclonal antibody fluorescent. To quantify the genotoxic and cytotoxic damages caused by the incorporation of BrdU in erythrocytes, mice were treated with doses of 0.50, 0.25 or 0.125 mg of BrdU per gram of body weight and 0.5 Gy of gamma radiation, using the micronucleus test. On the other hand, bone marrow cells were treated in the following manner: a) 0.125 mg of BrdU per g of body weight; b) 0.5 Gy of gamma radiation; c) combination of both agents. Damage to DNA for leukocytes and bone marrow cells was determined by the unicellular gel electrophoresis assay.

Due to the toxicity of BrdU, it was not possible to determine its incorporation in peripheral blood leukocytes, although they were well stimulated with Filgrastim. In the case of normoblasts, the frequency of polychromatic erythrocytes was determined and a synergistic cytotoxic effect between BrdU and radiation was observed. For the analysis of genotoxicity the frequency of micronuclei was determined but it was not possible to carry out an appropriate analysis, because the BrdU blocked cell division and did not allow to visualize micronuclei. The synergistic effect of small doses of BrdU on the cytotoxic effect of gamma radiation on the DNA of bone marrow cells was evidenced.

CONTENIDO

Abreviaturas	i
Índice de Tablas	ii
Índice de Figuras	iii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	
1. La Radiación Ionizante y su interacción con la materia viva	2
1.1 Generalidades	
1.2 Físico-química de absorción de energía	
1.2.1 Fase Física	
1.2.2 Fases Química	
1.2.3 Fase Molecular o Bioquímica	
1.3 Daño radioinducido en el ADN	
1.3.1 Tipos de daño	
1.3.2 Alteración de la Integridad reproductiva y Muerte celular	
1.3.3 Evaluación de los daños genotóxico y citotóxico	
2. La Radiación Ionizante y su uso en la medicina: Radioterapia	8
2.1 Generalidades	
2.2 Tratamiento de enfermedades hematológicas: Irradiación a cuerpo entero	
2.3 ¿Es posible incrementar la eficiencia de la radioterapia?	
3. Radiosensibilidad y radiosensibilizadores	9
3.1 Generalidades	
3.2 Fármacos radiosensibilizadores y mecanismos de radiosensibilización	
3.3 Estudios preclínicos y clínicos con radiosensibilizadores y radioterapia concomitante	
4. La Bromodesoxiuridina como radiosensibilizador	11
4.1 Generalidades	
4.2 Interacción de la BrdU con la radiación	

4.3 Estudios preclínicos y clínicos con BrdU y radioterapia concomitante

CAPÍTULO III: OBJETIVOS

3.1 Hipótesis	
3.2 Objetivo General	14
3.3 Objetivos Específicos	14
3.3.1 Tipo celular: leucocitos de sangre periférica	14
3.3.2 Tipo celular: normoblastos	
3.3.3 Tipo celular: médula ósea	

CAPÍTULO IV: MATERIAL Y METODOS

4.1 Línea experimental. Determinación del daño al ADN de leucocitos de sangre periférica debido a la incorporación de BrdU, empleando el método de electroforesis unicelular en gel	17
4.1.1 Recuento de leucocitos de sangre periférica	17
4.1.2 Análisis de la cinética del Filgrastim en función del aumento de leucocitos recientemente diferenciados en sangre periférica	18
4.1.3 Determinación de la incorporación de BrdU en células de la médula ósea de ratón	19
4.1.4 Protocolo para determinar la incorporación de BrdU en leucocitos de sangre periférica, después de la administración de Filgrastim	22
4.1.5 Protocolo para determinar el daño inducido por acción de la BrdU en leucocitos de sangre periférica de ratones, después de la administración de Filgrastim	25
4.2 Línea Experimental. Determinación del daño en el ADN de normoblastos debido a la incorporación de BrdU y de radiación gamma, empleando el ensayo citogenético para la detección de micronúcleos	27
4.3 Línea Experimental. Medición del daño al ADN debido a la incorporación de bajos niveles de BrdU y a la acción de radiación gamma en células de la médula ósea de ratones in vivo	29

CAPÍTULO V: RESULTADOS

5.1 Línea Experimental. Determinación del daño radio-inducido al ADN de Leucocitos de Sangre Periférica debido a la Incorporación previa de BrdU	
5.1.1 Recuento de leucocitos de sangre periférica	32
5.1.2 Análisis de la cinética del Filgrastim en función del aumento de leucocitos recientemente diferenciados en sangre periférica	32
5.1.3 Determinación de la incorporación de BrdU en células de la médula ósea de ratón	34
5.1.4 Determinación la incorporación de BrdU en leucocitos de sangre periférica	35
5.2 Línea Experimental. Determinación de los efectos radiosensibilizadores citotóxico y genotóxico en normoblastos debido a la incorporación de BrdU	37
5.3 Línea Experimental. Medición del daño al ADN debido a la acción de radiación gamma en células de la médula ósea de ratones in vivo con su ADN sustituido con BrdU	39
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN	44
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	
7.1 Línea experimental. Determinación del daño radio-inducido al ADN de leucocitos de sangre periférica debido a la incorporación previa de BrdU	46
7.2 Línea Experimental. Determinación de los efectos radiosensibilizadores citotóxico y genotóxico en normoblastos debido a la incorporación de BrdU	46
6.3 Línea Experimental. Medición del daño al ADN debido a la acción de radiación gamma en células de la médula ósea de ratones in vivo con su ADN sustituido con BrdU	47
CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS	48
CAPÍTULO IX: ANEXO	51

ABREVIATURAS

BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Gy	Gray
rhG-CSF	Factor recombinante humano estimulante de colonias de granulocitos
OMS	Organización Mundial de la Salud
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
MN	Micronúcleo
EPC	Eritrocito policromático

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 5.1.	Conteos de granulocitos empleando las técnicas con líquido de Türk y con azul tripano, en ambos casos con un factor de dilución de 25.	32
Tabla 5.2.	Conteos de granulocitos empleando Filgrastim a diferentes dosis, mediante la técnica con líquido de Türk y cámara de Neubauer.	33
Tabla 5.3.	Porcentaje de células de la médula ósea que incorporaron BrdU en función de la dosis y teñidas con Hoechst 33258.	35
Tabla 5.4.	Porcentaje de cambio en la cantidad de leucocitos recientemente diferenciados en sangre periférica, tratados con Filgrastim, BrdU y ambos agentes.	36
Tabla 5.5.	Efecto de la BrdU sobre la sobre la Citotoxicidad inducida por la exposición a radiación gamma, medida por frecuencia de EPC.	37
Tabla 5.6.	Efecto de la BrdU sobre la sobre la Genotoxicidad inducida por la exposición a radiación gamma, medida por frecuencia de MN.	38
Tabla 5.7.	Efecto de la incorporación de BrdU al DNA de células de la médula ósea, sobre el daño inducido por radiación gamma.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Mecanismos de interacción de radiación ionizante con la materia viva.	3
Figura 2.2.	Visualización de la integridad del ADN, mediante el ensayo Cometa.	6
Figura 2.3.	Micrografía que muestra eritrocitos EPC y EPC con presencia de micronúcleos (EPC-MN).	7
Figura 2.4	Estructura química de la Timidina y de su análogo BrdU.	11
Figura 4.1.	Esquema de la retícula de la Cámara de Neubauer.	18
Figura 4.2.	Leucocitos vistos al microscopio óptico con un objetivo de 40 X, empleando azul tripano y líquido de Türk, respectivamente.	18
Figura 5.1.	Aumento de la tasa de leucocitos recientemente diferenciados en sangre periférica empleando Filgrastim a una dosis única de 12 µg.	33
Figura 5.2.	Micrografía de células de la médula ósea, teñidas con Hoechst 33258.	35
Figura 5.3.	Micrografía de leucocitos de sangre periférica ósea, teñidas con Hoechst 33258.	36
Figura 5.4.	Histograma que indica el porcentaje de células de la médula ósea para cada rango de los momentos de la cauda, pertenecientes al grupo control.	39
Figura 5.5	Histograma que indica el porcentaje de células de linfocitos de sangre periférica para cada rango de los momentos de la cauda, pertenecientes al grupo control.	40
Figura 5.6.	Histograma que indica el porcentaje de células de la médula ósea para cada rango de migración de la cauda, pertenecientes al grupo control. El 75 % de las células no presentaron daño.	41
Figura 5.7.	Histograma que indica el porcentaje de células de la médula ósea para cada rango de migración de la cauda, pertenecientes al grupo tratado con BrdU y radiación, en el tiempo 21. El 55% de las células no presentaron daño.	41
Figura 5.8.	Histograma que indica el porcentaje de células de la médula ósea para cada rango de migración de la cauda, pertenecientes al grupo tratado con BrdU, en el tiempo 21. El 71.4 % de las células no presentaron daño.	42

Figura 5.9. Histograma que indica el porcentaje de células de la médula ósea para cada rango de migración de la cauda, pertenecientes al grupo tratado con radiación gamma, en el tiempo 21. El 71% de las células no presentaron daño. 43

I. INTRODUCCIÓN

La OMS, prevé que entre 2007 y 2030 aumentará en un 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial (OMS, 2012) y en México, a partir de 1990 los tumores malignos representan la segunda causa de muerte en la población general, según el INEGI (INEGI, 2012). Esta tendencia resulta preocupante y por ello numerosas investigaciones científicas se encaminan a analizar esta problemática.

Limitar la dosis de radiación en radioterapia empleando radiosensibilizadores, puede permitir reducir el daño a los tejidos sanos y potenciar los efectos nocivos sobre células cancerosas. Los radiosensibilizadores son agentes exógenos que provocan un aumento en el daño inducido por la radiación o bloquean la reparación celular.

Se ha demostrado que la 5-bromodesoxiuridina (BrdU) es un agente radiosensibilizante eficaz en células que se dividen rápidamente. Se diseñaron una serie de experimentos para determinar la radiosensibilización en función del daño al ADN en leucocitos de sangre periférica, normoblastos y células de la médula ósea. Estos tres tipos celulares poseen diferente radiosensibilidad inherente. Fue de especial interés analizar el daño al ADN de leucocitos y de células de la médula ósea en cada célula de manera individual, mediante el ensayo cometa. Para el análisis del daño al ADN de normoblastos se empleó la frecuencia de micronúcleos.

II. MARCO TEÓRICO

1. La Radiación Ionizante y su Interacción con la Materia Viva

Con el descubrimiento de los rayos X por Roëntgen en 1895 y el consecuente hallazgo de la radiactividad en 1896 por Becquerel, la investigación y el uso de la radiación ionizante llegaron a estar íntimamente ligados, permitiendo entender cada vez más su naturaleza en relación a la estructura atómica y el decaimiento radiactivo (Turner, 2005).

1.1 Generalidades

La radiación ionizante, es aquella que posee energía suficiente para provocar fenómenos de excitación e ionización en los átomos que atraviesa. Puede estar presente en forma de radiación electromagnética (rayos X y gamma) o de partícula tanto cargada (protón, alfa, deuterón, beta) como no cargada (neutrón) (Attix, 1986).

El efecto fotoeléctrico, dispersión Compton y producción de pares, son los principales mecanismos por medio de los cuales un fotón puede depositar su energía en el tejido (Turner, 2005), como se observa en la Figura 2.1. El efecto Compton predomina a energías empleadas en radioterapia y predomina en medios de bajo número atómico como es el caso del cuerpo humano.

1.2 Físico - Química de la Absorción de Energía

La radiación lesionará a las células dependiendo de cómo actúe, dónde actúe y de la dosis absorbida por la materia viva.

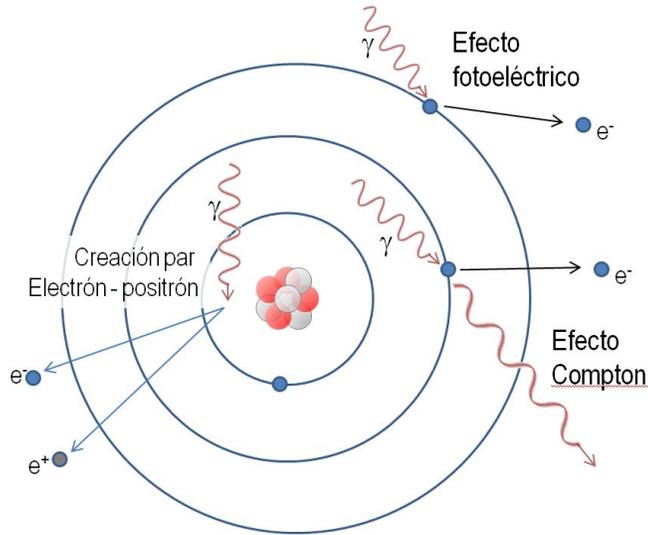


Figura 2.1. Mecanismos de interacción de radiación ionizante con la materia viva.

1.2.1 Fase Física

La interacción física entre la materia y la radiación es un fenómeno aleatorio que está asociado a cambios a nivel energético de los electrones orbitales, produciéndose absorción de energía en forma de ionización o excitación. Cuando la energía transferida por el fotón durante la interacción es mayor que la energía de enlace de los electrones atómicos, estos pueden ser expulsados del átomo y formar cationes. El átomo ionizado quedará inestable, pudiendo reaccionar para formar radicales libres o moléculas estables.

Un átomo sufre una excitación, si la energía que absorbe un electrón a partir de un fotón no es suficiente como para expulsar al electrón del átomo, pero sí para hacerlo cambiar a un nivel energético superior reintegrando la energía en forma de radiación electromagnética o degradándose a calor.

1.2.2 Fase Química

Aunque la interacción de la radiación con la célula no es selectiva, se sabe bien que el blanco más crítico de la radiación es el ADN. Este daño al ADN y a otras proteínas celulares induce cambios en la estructura y funcionalidad de la célula mediante acción directa y/o acción indirecta.

La acción directa o teoría del impacto, ocurre cuando la energía ionizante se deposita por sí misma en el ADN o en algún otro blanco molecular o es transferida al ADN por ionizaciones sucesivas sobre su capa de solvatación (Peoples A. R., 2012).

El efecto indirecto, tiene lugar cuando la energía se deposita en el agua que rodea al ADN, generando radicales hidroxilo (OH^\cdot) y protones (H^+). Estos radicales presentan una alta reactividad química y cuando se unen a una molécula próxima pueden alterarla, inactivarla o destruirla, perdiendo la función que ésta realizaba. Alrededor de dos tercios del daño a la materia, es causado por radiación electromagnética y electrones que interactúan de forma indirecta (Hall E.J., 2006).

1.2.3 Fase Molecular o Bioquímica

Los iones formados en la acción indirecta pueden combinarse y formar una nueva molécula de agua:



O bien, se pueden formar otras moléculas como el peróxido de hidrógeno, altamente oxidante



o formar nuevos radicales libres con diferentes sustancias próximas (R)



Se considera que dos tercios del daño producido por la radiación al ADN es provocado por el radical OH^\cdot , altamente reactivo, el cual puede viajar hasta alcanzar el blanco molecular en donde

puede reaccionar formando peróxido de hidrógeno (H_2O_2), forma no recuperable del material genético y es uno de los causantes de estrés oxidativo celular (Hall E.J., 2006).

1.2 Daño radioinducido en el ADN

La respuesta de las células frente a la exposición a la radiación, está influenciada por múltiples factores, que incluyen la dosis, la tasa de dosis, calidad de la radiación, la radiosensibilidad celular, fase del ciclo celular en el momento de la exposición y la eficacia de los mecanismos de reparación en la molécula de ADN.

1.3.1 Tipos de daño

El ADN puede ser dañado por la radiación ionizante mediante ruptura en una cadena, ruptura en las dos cadenas, sustitución o pérdida de una base nitrogenada, ruptura del enlace de hidrógeno entre las dos cadenas o bien ruptura de la unión ADN – ADN.

Los mamíferos han desarrollado mecanismos de reparación del ADN a fin de mantener la estabilidad genómica, como son la escisión de bases o de nucleótidos, corrección de errores de apareamiento de bases, las recombinaciones homóloga y no homóloga; también, por los mecanismos antioxidantes como el secuestro de radicales libres, transferencia de protones de hidrógeno a los radicales de ADN, producción de estado de anoxia en las proximidades del ADN e inhibición de apoptosis (Sterpone S., 2010).

1.3.2 Alteración de la Integridad Reproductiva y Muerte Celular

Si el daño en el ADN no es reparado, la célula puede entrar en un proceso de muerte celular programada denominada apoptosis o puede sufrir la pérdida de la capacidad reproductiva. Si las células que fueron dañadas logran dividirse, pueden dar lugar a mutaciones. Si estas células no son eliminadas por los mecanismos de reconocimiento de proteínas extrañas, pueden dar lugar a cáncer.

Existen evidencia de que la apoptosis puede ser desencadenado por la formación previa de radicales libres que lesionen el material genético. En este caso, la flexibilidad de la membrana celular es afectada; el núcleo muestra una condensación de la cromatina y una fragmentación de las cadenas de ADN por la activación de caspasas.

1.3.3 Evaluación de los Daños Genotóxico y Citotóxico

Los agentes citotóxicos poseen la capacidad de afectar la estructura y función celular pudiendo ocasionar la muerte de la célula. Un agente genotóxico es capaz de alterar química o estructuralmente al ADN, teniendo consecuencias en la célula o en sus descendientes; al actuar sobre las células somáticas participan en la iniciación de cáncer.

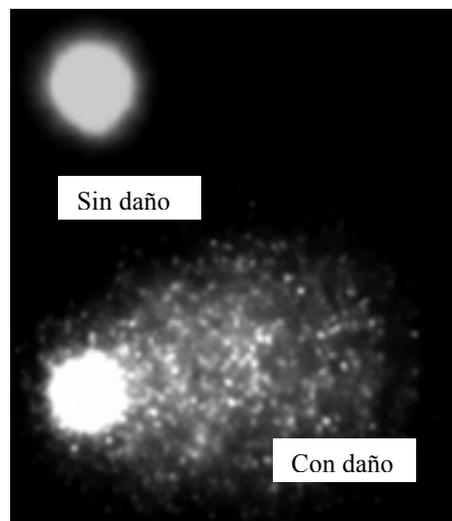


Figura 2.2. Visualización de la integridad del ADN, mediante el ensayo Cometa.

La electroforesis unicelular en gel, que es también conocida como ensayo cometa, es un método muy sensible empleado para medir el daño y la reparación del ADN en células individuales, requiriendo un bajo número de ellas. La versión alcalina del ensayo cometa es la de mayor uso, la que permiten detectar lesiones específicas en las bases si se combinan con endonucleasas

específicas (Tice R., 1990). El ensayo cometa, se considera una herramienta poderosa y útil en la evaluación de genotoxicidad de forma inmediata.

El principio del ensayo se basa en la migración de fragmentos de ADN liberados de las cadenas rotas que fácilmente migran hacia un electrodo positivo o ánodo sometidos a un campo eléctrico, dejando una impresión del ADN en forma de cometa que incluye una cabeza (donde el ADN no está fragmentado) y una cauda, cuya longitud refleja la gravedad del daño.

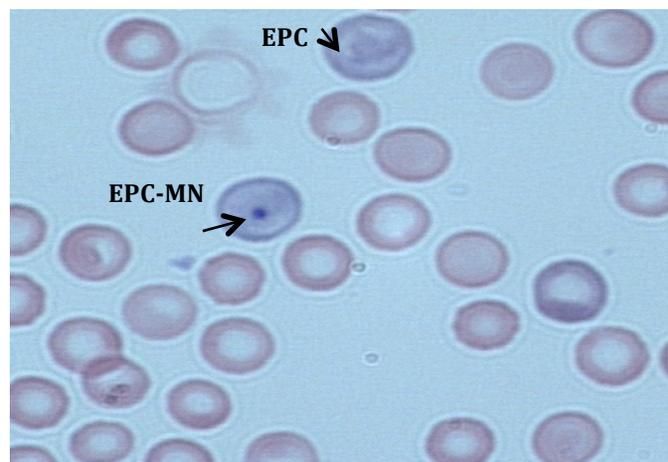


Figura 2.3. Micrografía que muestra eritrocitos EPC y EPC con presencia de micronúcleos (EPC-MN).

El ensayo de micronúcleos, es una forma eficiente de medición del daño al material genético. Al producirse rupturas en el ADN en el momento de la división celular, el material genético desprendido puede derivar en fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante anafase mitótica (Morales-Ramírez P., 1994). Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el principal denominado micronúcleo (MN), visible fácilmente al microscopio óptico. Esta técnica ofrece las ventajas de rapidez, facilidad, abundancia de células analizables en diferentes periodos del ciclo celular y no da lugar a dudas sobre el daño producido. Sin embargo, no es útil en poblaciones celulares que no se dividen y no detecta agentes que no producen pérdidas de material genético. Al aplicar la técnica en eritrocitos

de sangre periférica, es posible determinar la frecuencia de MN en eritrocitos jóvenes llamados eritrocitos policromáticos (EPC) lo que es un indicador de daño genotóxico causado por agentes clastógenos o aneuploidógenos; la frecuencia de EPC en eritrocitos maduros o normocrómicos indica el daño citotóxico.

2. La Radiación Ionizante y su Uso en la Medicina: la Radioterapia

2.1 Generalidades

La radioterapia se ha distinguido como uno de los tres métodos primarios para tratamientos oncológicos, junto con la cirugía y la quimioterapia (El IMSS en Cifras, 2005). Aproximadamente, el 60% de los pacientes requerirán radioterapia en algún momento de la evolución de su enfermedad, ya sea para el control total del tumor o para ayudar a reducir su tamaño antes de otro tratamiento (INEGI, 2012).

2.2 Tratamiento de enfermedades hematológicas: Irradiación a cuerpo entero

El trasplante de médula ósea es indicado como uno de los tratamientos de algunas enfermedades de tipo hematológico como la anemia aplásica, leucemia mieloblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin y mieloma múltiple. El acondicionamiento pre-trasplante incluye la ablación de la médula ósea, ya sea por quimioterapia o por irradiación a cuerpo entero.

En el tratamiento mieloablativo con radioterapia externa se utiliza un esquema de dosis fraccionada, administrando dosis totales de radiación de entre 1000 a 2000 cGy. Sin embargo, es empleada con reserva a causa de su toxicidad, especialmente sobre las mucosas, razón por la cual la dosis óptima ablativa no ha sido claramente definida (Appelbaum F., 1992).

2.3 ¿Es posible incrementar la eficiencia de la radioterapia?

El empleo de fármacos radiosensibilizadores en radioterapia ha permitido incrementar los efectos citotóxicos sobre las células tumorales y reducir los efectos sobre el tejido sano circundante, ya que no tienen efectos antitumorales. Debido a esto, aumentan la eficiencia de la radioterapia de cáncer al cumplir con el principio fundamental de esta especialidad: “mayor radiación al tejido tumoral y menor daño al tejido sano circundante”. Al poseer los fármacos una gran afinidad electrónica, reaccionan con los radicales libres del ADN y adquieren la capacidad de contrarrestar la hipoxia celular asociada a la radioresistencia (Wardman P., 2007).

3. Radiosensibilidad y Radiosensibilizadores

3.1. Generalidades

En 1906, los franceses Bergonié y Tribondeau postularon una ley que lleva su nombre que versa sobre la radiosensibilidad inherente de los tejidos vivos: cuanto menor sea su diferenciación celular y mayores sean su actividad mitótica y su actividad metabólica, más radiosensible es el tejido. Para los 50's del mismo siglo, se pudieron cuantificar estos efectos mediante el uso de cultivos celulares, lo que permitió establecer la relación entre dosis de radiación administrada y su respuesta. El que un tratamiento con radiación pueda controlar el cáncer es atribuido, entre otros factores, a la diferencia entre la radiosensibilidad intrínseca de las células tumorales y a su capacidad de reparar el daño sufrido en cada sesión (Weichelbaum R., 1976).

3.2 Fármacos radiosensibilizadores y mecanismos de radiosensibilización

En 1955, Thomlinson y Gray pusieron de manifiesto el poder del oxígeno en la muerte celular por radiación, al estudiar la presencia de células hipóxicas en muestras de carcinoma bronquial. se considera al oxígeno como uno de los primeros radiosensibilizadores, ya que favorece la fijación del daño radioinducido.

Para los 60's, comenzaron una serie de estudios en busca de sustancias o componentes que tuvieran un efecto análogo al oxígeno en cuanto a su función radiosensibilizante (Hall E.J., 2006;

Powathil G., 2012). Fármacos antiinflamatorios no esteroideos como el diclofenaco, indometacina y el piroxicam, son capaces de inhibir la respiración mitocondrial incrementando la cantidad de oxígeno, además de involucrar mecanismos de sincronización celular (Crokart N., 2005).

Antibióticos de la familia de la Ansamicina como la geldanamicina, causan degeneración selectiva de proteínas intracelulares reguladoras de procesos como proliferación, modulación del ciclo celular y modulación de señales de reparación, incrementando la respuesta celular a los efectos de la radiación (Appelbaum F., 1992). La combinación de un inhibidor glucolítico como la 2-desoxi-D-glucosa con la 6-aminonicotinamida, inhibidor de la hexosa monofosfato, resultaron efectivos en la disminución de los tamaños tumorales (Varshney R., 2004). También se han investigado ciertos promotores de concentración de óxido nítrico, enfocándose en el metabolismo de nucleótidos, como los análogos a la timidina, fluoropirimidinas, iodopirimidinas y la fluorocitocina (Zaucha R., 2006).

Actualmente, a los radiosensibilizadores se les agrupa en dos clases: las pirimidinas halogenadas y los nitroimidazoles. Estos últimos actúan en condiciones anaeróbicas pero al igual que el oxígeno, facilitan el daño por radicales libres y son muy eficaces debido a que poseen una gran afinidad electrónica, no obstante de que algunos son neurotóxicos (Krause W., 2005). Las pirimidinas halogenadas actúan sobre las células bien oxigenadas y son la 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) y la 5-yodo-2-desoxiuridina. En estas, se ha sustituido el hidrógeno de la posición 5 del anillo pirimidínico por un átomo de bromo o yodo, de tal manera que pueden sustituir a la timidina en el ADN, alterando sus propiedades fisicoquímicas y haciéndolo más sensible a la radiación (Watanabe R., 2001; Fan J., 2005). En la Figura 2.4 se muestra la diferencia entre la estructura de la desoxitimidina y la BrdU.

3.3 Estudios preclínicos y clínicos con radiosensibilizadores y radioterapia concomitante

Diversas investigaciones han demostrado los efectos radiosensibilizantes de la gemcitabina, un análogo de la pirimidina, tanto in vitro como in vivo. Se estudiaron diversos tipos de tumores sólidos principalmente de pulmón, colon, páncreas, cabeza y cuello, vejiga, ovario y mama

(Morales-Ramírez P., 1980). Se demostró un aumento de la acción de la radiación con un cociente de potenciación 1.2 a 3.

El tratamiento combinado disulfiram- radioterapia *in vivo*, redujeron significativamente los volúmenes tumorales y prolongaron la supervivencia de los modelos de ratones en comparación con tratamientos únicos (Tice R., 1990).

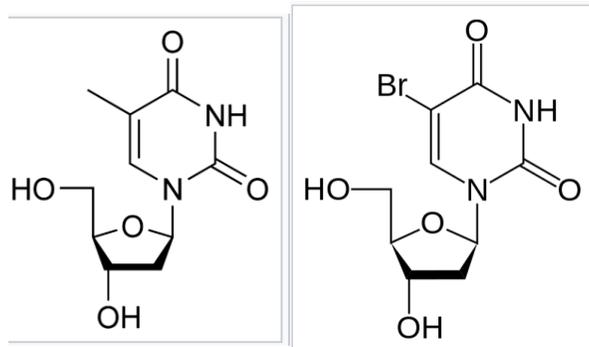


Figura 2.4. Estructura química de la Timidina y de su análogo BrdU.

La 2-desoxi-D-glucosa causa citotoxicidad en las células cancerosas al interrumpir el metabolismo del tior, y el MLN4924 provoca la acumulación de sustratos que desencadenan la apoptosis. Derivado de un estudio clínico, se ha concluido que un tratamiento con los dos agentes incrementó la eficiencia de la radioterapia al superar la radiorresistencia de las células cancerosas y obteniendo un aumento en la radiosensibilidad de células de cancer de mama de 1.41 (Tice R., 1990).

4. La Bromodesoxiuridina como radiosensibilizador

4.1 Generalidades

La incorporación de BrdU afecta la pendiente y el ancho del hombro de la curva de supervivencia celular a la radiación; el aumento en la pendiente de la curva es cuantitativamente similar al

incremento de la inducción del daño al ADN, lo que sugiere la relación causa-efecto entre estos fenómenos. La disminución del ancho del hombro no se ha correlacionado con el aumento en el daño, lo que sugiere que, probablemente, estén relacionados con la fijación del daño potencialmente letal sobre células que contienen BrdU (Iliakis G., 1989).

4.2 Interacción de la BrdU con la radiación

Hasta el momento no se ha establecido con certeza el mecanismo de acción de la BrdU; sin embargo, se ha sugerido que altera la estabilidad del ADN, aumentando el riesgo de intercambio de cromátidas hermanas, mutaciones y rupturas de doble cadena (Taupin P., 2006).

Hay evidencia de que la radiosensibilización por la BrdU, ocurre de acuerdo a reacciones sucesivas que finalizan con la ruptura de las cadenas de ADN. El rompimiento en exceso de las hebras de ADN provocado, es quizá inducido por radicales bromouracilo altamente reactivos, a través de los mecanismos de depósito directo de energía y/o por electrones hidratados (Watanabe R., 2001; Fan J., 2005). Se observó un aumento en la susceptibilidad a la radiohidrólisis en cadenas sustituidas, aproximadamente tres veces más en las simples que en las dobles. Se ha concluido que la radiosensibilización es menor en cadenas bifilarmente sustituidas con el análogo comparado con material unifilarmente sustituido (Lawrence T.S., 1994).

Se han sugerido probables rutas de radiosensibilización por BrdU. En primer lugar, al incidir un electrón sobre el ADN existe una captura electrónica similar por parte de la timidina o el bromouracilo, formando radicales aniónicos. Se ha demostrado que la interacción de la timidina con los electrones hidratados, producen radicales estables que pueden convertirse nuevamente en timidina mediante reacciones secundarias.

Sin embargo, la reacción de electrones hidratados con la BrdU produce iones bromuro y radicales uracilo. Estos últimos son altamente reactivos y pueden producir diferente tipos de daño dependiendo de su entorno. La reacción más común es la remoción de átomo de hidrógeno del

azúcar de las bases vecinas, con la consecuente pérdida de la base y la ruptura de una cadena (Erickson R., 1963).

Posteriormente, el radical puede dirigirse a la hebra opuesta como resultado de la movilidad de los electrones en los anillos heterocíclicos de las bases. Aunque se sabe que el daño en el ADN por la radiación es repartido de manera aleatoria, existe evidencia que indica que la ruptura de las cadenas del ADN ocurre sobretodo en regiones de una sola hebra donde hay sustitución de las bases por la BrdU.

4.3 Estudios preclínicos y clínicos con BrdU y radioterapia concomitante

Las publicaciones iniciales sobre toxicidad por BrdU, demostraron que puede inducir la ruptura cromosómica y aumentar la sensibilidad de las células tratadas con radiación ionizante, revelando su potencial para ser empleada como coadyuvante en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer: de cabeza y cuello, hepáticos, pancreáticos, glioblastomas y sobre diversas líneas de tejidos tumorales humanos (Erickson R., 1963).

Se ha observado que la BrdU provoca inhibición en la proliferación celular y alteración en las células de la médula ósea; que incrementa el efecto citotóxico del radiofármaco $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ sobre los normoblastos (Morales-Ramírez P., 2010) y que aumenta significativamente la cantidad de micronúcleos, señal de daño, sobre eritrocitos a la acción de radiación gamma (Kalia V., 1994).

En una evaluación en fase clínica, (Russo A., 1984) demostraron que la administración de BrdU producen un aumento de radiosensibilidad en gliomas.

III. OBJETIVOS

La pregunta que se pretende responder es: ¿Se puede aumentar la eficiencia radiosensibilizadora de la BrdU sobre los leucocitos, normoblastos y células de la médula ósea de ratones *in vivo*?

3.1 HIPÓTESIS

H₀: No es posible aumentar la eficiencia radiosensibilizadora de la BrdU, sobre los leucocitos, normoblastos y células de la médula ósea de ratones *in vivo*.

H₁: Es posible aumentar la eficiencia radiosensibilizadora de la BrdU, sobre los leucocitos, normoblastos y células de la médula ósea de ratones *in vivo*.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones que permitan maximizar el efecto radiosensibilizador de la BrdU, para aumentar el daño al ADN causado por radiación externa en leucocitos, normoblastos y células de la médula ósea de ratones *in vivo*.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.3.1 Tipo celular: Leucocitos de sangre periférica

- Establecer el rango de la cantidad de leucocitos de sangre periférica en ratones Balb/c del bioterio del ININ, empleando líquido de Türk y azul Tripano y como instrumento la cámara de Neubauer.

- Determinar la dosis de Filgrastim y el tiempo post-dosis con los cuales se obtiene una mayor estimulación de la división en leucocitos de ratón *in vivo* recientemente diferenciados en sangre periférica.
- Determinar las dosis de BrdU que corresponde a la CE₅₀, la cual no resulta altamente tóxica y permite determinar la incorporación de BrdU.
- Medir el daño en el ADN de leucocitos estimulados por Filgrastim, debido a la incorporación de BrdU y a la acción de la radiación gamma, mediante el ensayo Cometa.
- Estudiar la variación de la dosis de BrdU sobre la respuesta celular a la exposición a radiación gamma.

3.3.2 Tipo celular: Normoblastos

- Determinar el efecto citotóxico en normoblastos de ratón *in vivo* debido a la incorporación de BrdU y a la acción de la radiación gamma, empleando como indicador la frecuencia de eritrocitos policromáticos.
- Determinar el efecto genotóxico en normoblastos debido a la incorporación de BrdU y a la acción de la radiación gamma, empleando como indicador la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos.
- Comparar los resultados obtenidos del ensayo de MN a distintas dosis de BrdU.

3.3.3 Tipo celular: Médula ósea

- Determinar el efecto de la incorporación de la BrdU sobre la sensibilización causada por la radiación en células de la médula ósea de ratón *in vivo*, utilizando el ensayo cometa.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio con leucocitos, como un paso previo a la determinación del daño al ADN por la acción combinada BrdU-radiación, se diseñaron experimentos para favorecer la incorporación de la BrdU en estas células, debido a que no están en división celular. Para este fin, se utilizó un estimulante hematopoyético denominado factor recombinante humano estimulante de colonias de granulocitos (rhG-CSF) comercialmente conocido como Filgrastim. Para el análisis de daño, se tiñeron las células con Hoechst 33258 y con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU conjugado con Alexa – flúor 488.

La inestabilidad genética en normoblastos generada por la incorporación de la BrdU fue determinada mediante la detección de micronúcleos. En esta prueba sólo es suficiente una gota de sangre se fijaron las células con metanol y se tiñeron con Giemsa.

Para establecer si es posible determinar el efecto de la incorporación de bajos niveles de BrdU sobre la inducción de daño al ADN por radiación gamma en células de la médula ósea de ratones *in vivo*, se empleó el ensayo de electroforesis unicelular en gel y se midió la migración de la cauda.

- **Animales**

Para todos los experimentos descritos a continuación, se emplearon ratones machos de 2-3 meses de edad, de la cepa BALB/c, con un peso aproximado de 30 g, reproducidos y mantenidos en el bioterio del ININ bajo condiciones controladas de temperatura y periodos regulares de luz y obscuridad.

- **Administración de BrdU**

Para cada uno de los experimentos en los que se requirió administrar BrdU, se siguió la misma

técnica variando únicamente la dosis de este agente. Los ratones fueron anestesiados con éter e inyectados intraperitonealmente con BrdU a la dosis requerida en mg/g de peso corporal (PC), previamente adsorbida a carbón activado de entre 250-300 mallas con una relación de 20 mg de BrdU por cada 100 mg de carbón activado.

4.1 Línea Experimental. Determinación del Daño al ADN de Leucocitos de Sangre Periférica debido a la Incorporación de BrdU, Empleando el Método de Electroforesis Unicelular en Gel

4.1.1 Recuento de Leucocitos de Sangre Periférica

Con el propósito de establecer el rango en el que se encuentran la cantidad de leucocitos de los ratones BALB/c, tanto los niveles basales como las resultantes de algún tratamiento, se realizaron conteos de muestras de sangre periférica empleando la cámara de Neubauer. Se utilizaron las siguientes técnicas:

A) Método de Viabilidad con Azul Tripano

Se colocaron 46 μL de solución de Hanks en un tubo eppendorf y se mezclaron con 4 μL de sangre extraída de la cola del ratón y 50 μL de azul tripano, se resuspendió cuidadosamente. Se dejó reposar durante 10 min, tomando una alícuota de la mezcla con una pipeta Pasteur suficiente para llenar la cámara de Neubauer.

B) Método de Exclusión con Líquido de Türk

En un tubo eppendorf, se colocaron 1 μL de heparina, 4 μL de sangre extraída de la cola del ratón y 95 μL de líquido de Türk, sin resuspender. Se tomó una alícuota con la pipeta Pasteur y se llenó la cámara de Neubauer con ella.

C) Conteo de Leucocitos

Para ambas técnicas, se realizó el conteo en los cuatro cuadrados correspondientes a las esquinas (L) de la cámara de Neubauer, como se indica en la Figura 4.1, empleando un microscopio óptico.

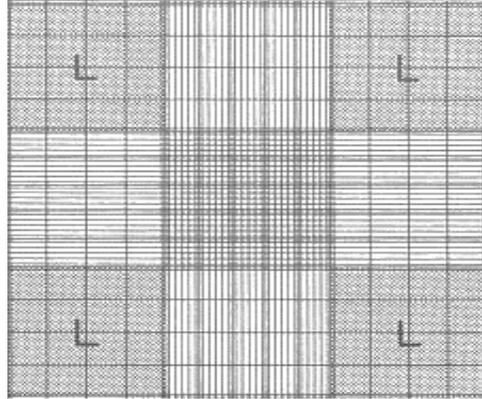


Figura 4.1. Esquema de la retícula de la Cámara de Neubauer.

con un objetivo de 40 X. Se discriminaron los leucocitos de los eritrocitos por su mayor tamaño y por ser refringentes, como se muestra en la Figura 4.2.

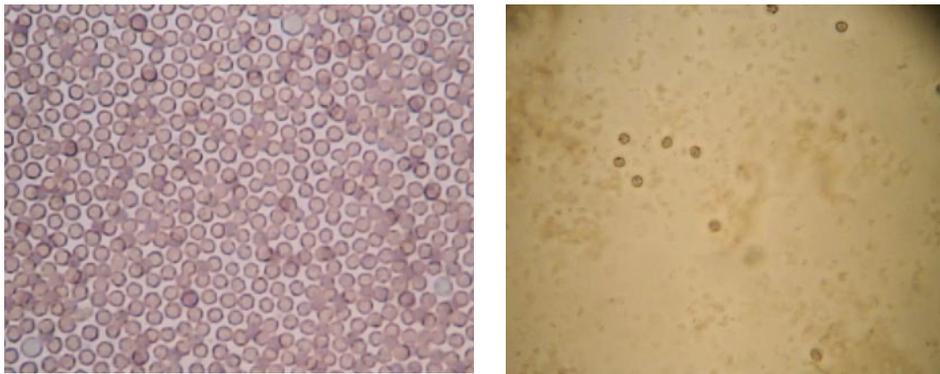


Figura 4.2. Leucocitos vistos al microscopio óptico con un objetivo de 40 X, empleando azul tripano y líquido de Türk, respectivamente.

4.1.2 Análisis de la Cinética del Filgrastim en Función del Aumento de Leucocitos Recientemente Diferenciados en Sangre Periférica

A) Administración de Filgrastim

Se realizaron dos experimentos:

- a) Se inyectó por vía subcutánea una dosis de 12 μg de Filgrastim a 6 ratones, aforando hasta 0.1 ml con solución glucosada al 5% en agua destilada.
- b) Se formaron tres grupos con dos ratones cada uno y se inyectaron por vía subcutánea a dosis de 12, 18 y 25 μg de Filgrastim, aforando hasta 0.1 ml con solución glucosada al 5% en agua destilada.

B) Toma de Muestras

Se extrajeron 5 μL de sangre de la cola de ratón a las 21, 24 y 27 h después de la administración del fármaco y una hora antes, para que cada ratón fuera su propio testigo. Después, se procedió con las técnicas de viabilidad con azul tripano y de exclusión con líquido de Türk, como se indicó en el apartado 4.1.1.

4.1.3 Determinación de la Incorporación de BrdU en Células de la Médula Ósea de Ratón

A) Grupos de Trabajo

Se realizaron 2 experimentos empleando las células de la médula ósea, con diferente objetivo cada uno.

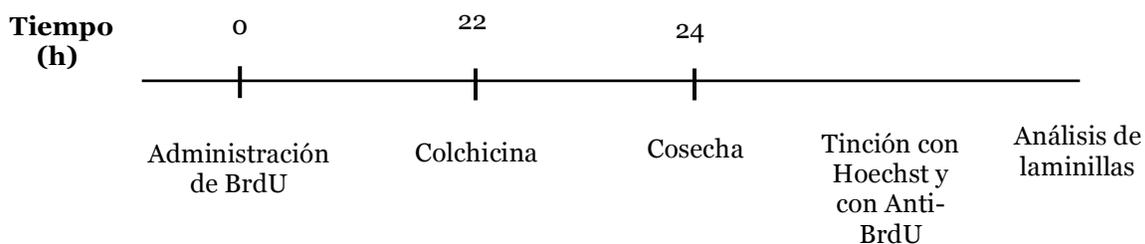
- a) Se formaron 4 grupos con dos integrantes cada uno, para determinar la dosis óptima de BrdU en base a su citotoxicidad, tiñendo con Hoechst 33258.

Grupo	Tratamiento
I	BrdU (1.25 mg/g PC)
II	BrdU (1.00 mg/g PC)
III	BrdU (0.75 mg/g PC)
IV	BrdU (0.50 mg/g PC)

b) Se formaron dos grupos con tres ratones cada uno, con el propósito de definir las condiciones idóneas para la tinción con anticuerpo monoclonal anti-BrdU fluorescente.

Grupo	Tratamiento
I	BrdU (1.50 mg/g PC)
II	BrdU (0.75 mg/g PC)

Protocolo



B) Administración de BrdU

Se utilizaron dosis de BrdU de 1.25, 1.00, 0.75 y 0.50 mg/g de peso corporal y de 1.50 y 0.75 mg/g de peso corporal según cada experimento antes citado.

C) Colchicina

La colchicina se administró en solución acuosa por vía subcutánea a dosis de 3.75 μ g/g de peso.

D) Cosecha y Obtención de Muestras

Se extrajeron ambos fémures de cada ratón y la médula ósea se colectó inyectando una solución

amortiguadora de fosfatos por un extremo del hueso. La suspensión celular obtenida se centrifugó y resuspendió en KCl (0.075 M), incubándose a 37 °C por 15 minutos. Se centrifugó nuevamente y se resuspendió en un fijador de metanol:ácido acético (3:1) haciendo dos cambios de fijador cada 15 o 20 minutos. Las células en fijador se gotearon sobre un portaobjetos limpio y frío.

E) Técnicas de Tinción

Las laminillas preparadas se tiñeron con alguna de las siguientes técnicas:

a) Tinción con Hoechst 33258

Se obtuvo un stock de 2500 µg de Hoechst por ml de agua. De este stock se tomó una alícuota de 10 µL y se aforó a 25 ml con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 1.16M con pH 7.0. A las laminillas secas a la intemperie, se les colocaron 70 µL del Hoechst diluido y un cubreobjetos. Se limpió el excedente de las aristas y se observó al microscopio de fluorescencia.

b) Tinción con Anticuerpo Monoclonal anti-BrdU Conjugado con Alexa – flúor 488

A cada laminilla se le dio un tratamiento con sosa al 0.07 N durante 2 ó 6 minutos para desnaturalizar al ADN. A continuación, se introdujeron las laminillas en un vaso Coplin con PBS (Buffer fosfato salino con pH de 8.5) para neutralizar la base y se enjuagaron con agua, para remover el exceso de sales. Se colocaron sobre la laminilla, una mezcla de diferentes concentraciones de anti-BrdU con 50 µL de Tween 20 al 0.5 % diluido con PBS. Se incubó en una cámara húmeda durante 30 minutos. Al cabo de ese tiempo, se lavaron con PBS y después con agua. Se secaron a la intemperie y se les colocó una gota de resina y un cubreobjetos.

F) Análisis de Laminillas

a) Se realizó el conteo de núcleos totales y de los que incorporaron BrdU, para obtener el porcentaje de estos últimos. Para determinar la frecuencia de los núcleos que incorporaron BrdU, se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

- Color: se observaron a los núcleos que incorporaron BrdU grisáceos u oscuros y pálidos o

blancos a los que no incorporaron BrdU.

- Forma: redondeada, bien limitada.

b) Se realizaron pruebas, variando la concentración de anti-BrdU y el tiempo en el que estuvieron las laminillas en sosa. Se observaron al microscopio de fluorescencia hasta determinar el mejor contraste entre los núcleos brillantes que incorporaron BrdU y los opacos que no incorporaron el agente.

4.1.4 Protocolo para Determinar la Incorporación de BrdU en Leucocitos de Sangre Periférica, después de la Administración de Filgrastim

A) Grupos de Trabajo

a) Se integraron tres grupos con tres ratones cada uno. Se realizó el conteo de leucocitos en cámara de Neubauer.

Grupo	Tratamiento
I	Filgrastim (18 µg)
II	BrdU (0.75 mg/g PC)
III	Filgrastim + BrdU (18 µg y 0.75 mg/g PC)

b) Se formaron tres grupos con dos ratones cada uno. Las células obtenidas se tiñeron con Hoechst 33258.

Grupo	Tratamiento
I	Filgrastim (18 µg)
II	BrdU (1.5 mg/g PC)
III	Filgrastim + BrdU (18 µg y 1.5 mg/g PC)

- c) Se integraron tres grupos con tres ratones cada uno. Se realizó la repetición del experimento anterior, pero esta ocasión se utilizó un anticuerpo monoclonal para la tinción de las células.

Grupo	Tratamiento
I	Filgrastim (18 µg)
II	BrdU (0.25 mg/g PC)
III	Filgrastim + BrdU (18 µg y 0.25 mg/g PC)

- d) Se formaron tres grupos con dos ratones cada uno y se emplearon diferentes dosis de BrdU. Las células obtenidas se tiñeron con Hoechst 33258.

Grupo	Tratamiento
I	BrdU (0.20 mg/g PC)
II	Filgrastim + BrdU (18 µg y 1.25 mg/g PC)
III	Filgrastim + BrdU (18 µg y 0.63 mg/g PC)
IV	Filgrastim + BrdU (18 µg y 0.32 mg/g PC)
V	Filgrastim + BrdU (18 µg y 0.20 mg/g PC)

B) Administración de Filgrastim

Se inyectó 0.1 ml por vía intraperitoneal a cada uno de los ratones, administrando una dosis de Filgrastim de 18 µg y completando con una solución glucosada al 5% en agua destilada.

C) Administración de BrdU

Cinco horas después de la administración de Filgrastim, los ratones se anestesiaron con éter y se inyectaron con BrdU a las dosis indicadas en la sección de grupos de trabajo.

D) Toma de Muestras

A cada ratón se le extrajo muestras de sangre de su cola a las 27 h después del tratamiento y antes del tratamiento, para que cada organismo fuera su propio testigo. Se realizó el conteo de leucocitos empleando el líquido de Türk de acuerdo con 4.2.1 inciso B.

E) Preparación de Laminillas

En un tubo eppendorf, se colocaron 1 μL de heparina, 40 μL de sangre extraída de la cola del ratón y 158 μL de líquido de Türk y resuspender en un fijador de metanol : ácido acético (3:1), hasta 0.5 ml. Se centrifugó la muestra por 10 min a 1500 revoluciones por minuto (rpm), se desechó el sobrenadante y se resuspendió nuevamente en el fijador. La suspensión celular en fijador se goteó sobre portaobjetos limpios.

F) Tinción con Hoechst 33258

Se obtuvo un stock de 2500 μg de Hoechst por ml de agua. De este stock se tomó una alícuota de 10 μL y se aforó a 25 ml con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 1.16M con pH 7.0. A las laminillas secas a la intemperie, se les colocaron 70 μL del Hoechst diluido y un cubreobjetos. Se limpió el excedente de las aristas y se observó al microscopio de fluorescencia.

G) Análisis

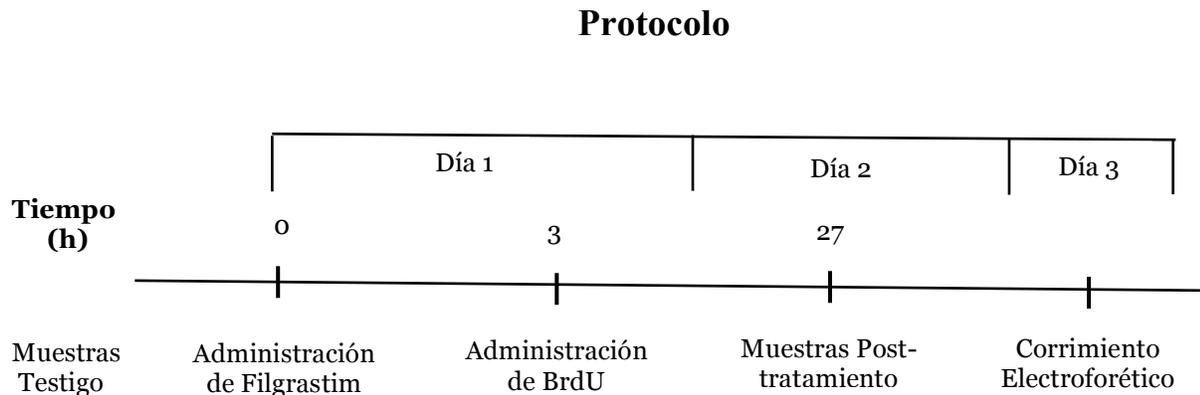
Se determinó la frecuencia de los núcleos que incorporaron BrdU, tomando en cuenta los siguientes criterios:

- Color: Grisáceos y opacos a diferencia de los que no han incorporado BrdU, los cuales se observarán en color blanco y brillante (fluorescentes).
- Forma: redondeada, bien limitada.

4.1.5 Protocolo para Determinar el Daño Inducido por Acción de la BrdU en Leucocitos de Sangre Periférica de Ratones, después de la Administración de Filgrastim

A) Grupos de Trabajo

Se formaron 4 grupos con 5 integrantes cada uno.



B) Administración de Filgrastim

Se inyectó 0.1 ml por vía intraperitoneal a cada uno de los ratones, administrando una dosis de Filgrastim de 18 μ g y completando con una solución glucosada al 5% en agua destilada.

C) Administración de BrdU

Tres horas después de la administración de Filgrastim, los ratones se inyectaron con BrdU a una dosis de 0.20 mg/g de peso corporal.

D) Procedimiento para la Preparación de Laminillas, mediante el Ensayo de Electroforesis Unicelular en Gel

La metodología empleada se basó en la técnica reportada por Singh y colaboradores (Singh N., 1988) con algunas modificaciones (Mendiola-Cruz M., 1999) que se emplearon en estudios previos (Morales-Ramírez P., 1980). A cada ratón se le extrajo muestras de sangre de su cola a las 27 h después del tratamiento y antes del tratamiento, para que cada organismo fuera su propio testigo. Se prepararon previamente los portaobjetos con una capa de 200 μ L de agarosa de punto de fusión normal (APFN al 0.75%) disuelta en PBS. A cada tiempo, se tomaron dos muestras de 4 ml de sangre completa y se transfirieron a un tubo para microcentrífuga conteniendo 1 ml de solución salina de Hanks. Se dejaron los tubos en hielo y una vez completadas todas las muestras, éstas se centrifugaron por 10 minutos a 2500 rpm, después se eliminó el sobrenadante.

El paquete celular se resuspendió en 100 ml de agarosa con punto de fusión bajo (APFB) al 0.5% disuelta en PBS y se colocaron las células sobre el portaobjetos cubierto previamente con APFN. A cada laminilla, se les puso un cubreobjetos por deslizamiento y se refrigeraron durante 5 minutos. Ya solidificada la capa de agarosa con las células, se les retiró el cubreobjetos y se les aplicó una última capa de 100 μ L de APFB y se repitió todo lo anterior. Posteriormente, se introdujeron las laminillas en solución de lisis a 4 °C por 1 hora. Al cabo de ese tiempo, se retiraron del refrigerador y se colocaron en la cámara de electroforesis cubriéndolas con un buffer alcalino para electroforesis a 4 °C preparado recientemente, durante 40 minutos, para permitir el desenrollamiento del ADN y la expresión del daño sensible al álcali. Después, se corrió la electroforesis a 25 volts y 300 miliamperes durante otros 40 min. Finalmente, las laminillas se enjuagaron con solución trizma 0.4 M y un pH de 7.5 y, como el análisis no fue inmediato, se deshidrataron con metanol.

E) Tinción de Laminillas

Para teñir a las laminillas, se preparó una solución stock 10X (20 μ g/ml) de bromuro de etidio, disolviendo 0.001 g del colorante en 5 ml de agua bidestilada filtrada. Se hizo una última dilución del 1 a 10 con agua y se refrigeró a 4 °C, tomando alícuotas de 70 μ l para cada análisis al microscopio.

F) Análisis de la Migración de ADN

El daño al ADN se determinó contando el porcentaje de ADN en la cauda del cometa de 100 células, empleando un analizador de imágenes Comet IV y un microscopio de fluorescencia con filtro de excitación de 515-560 nm y filtro barrera de 590 nm, con el objetivo de 25 x.

G) Análisis Estadístico

La prueba estadística utilizada para evaluar los efecto genotóxico y citotóxico, fue la t pareada con un valor de $p < 0.05$. Cada ratón se comparó con su muestra inicial.

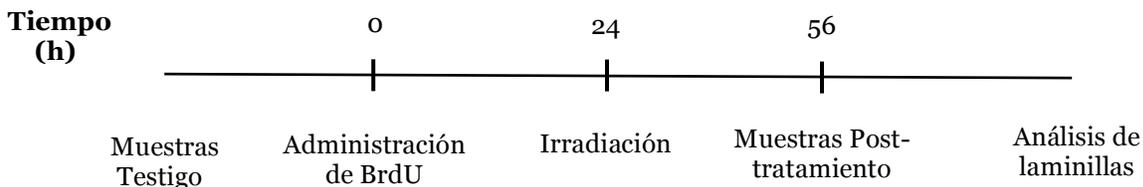
4.2 Línea Experimental. Determinación del Daño en el ADN de Normoblastos debido a la Incorporación de BrdU y de Radiación Gamma, empleando el Ensayo Citogenético para la Detección de Micronúcleos

A) Grupos de Trabajo

Se formaron 7 grupos, con 5 integrantes cada uno, de la siguiente manera.

Grupo	Tratamiento
I	Radiación (0.5 Gy)
II	BrdU (0.50 mg/g PC)
III	BrdU (0.25 mg/g PC)
IV	BrdU (0.12 mg/g PC)
V	Radiación + BrdU (0.5 Gy + 0.12 mg/g PC)
VI	Radiación + BrdU (0.5 Gy + 0.25 mg/g PC)
VII	Radiación + BrdU (0.5 Gy + 0.50 mg/g PC)

Protocolo



B) Administración de BrdU

Se inyectaron dosis de 0.125, 0.250 y 0.500 mg/g de peso corporal (PC).

C) Irradiación

Los animales, mantenidos en un brete recibieron 0.50 Gy de dosis de radiación gamma proveniente de una fuente de cobalto 60 (Gammacel).

D) Toma de Muestra y Tinción del Frotis (Morales-Ramírez P.,1994)

A los ratones se les tomó muestras de sangre de la cola antes del tratamiento, para que cada organismo fuera su propio testigo y a las 56 h después de la administración de la BrdU. Las muestras se recibieron en laminillas que contenían una gota de suero fetal de ternera y se realizaron los frotis, los cuales se tiñeron de acuerdo con el siguiente orden:

- Se tiñeron con MayGrunwald (0.3 mg en 100 ml de metanol) durante 1 min y se dejaron escurrir para quitar el exceso.
- Se tiñeron con MayGrunwald y agua (proporción 1:1) durante 1 min. Se enjuagaron con agua destilada y se dejaron escurrir.
- Se tiñeron con Giemsa (6%) durante 3 min. Se enjuagaron y se dejaron secar.
- Se colocaron en Xilol de 2 a 5 min. Se dejaron secar.
- Se les colocó una gota de resina y un cubreobjetos, para hacer las laminillas permanentes.

E) Conteo

Cada laminilla se analizó bajo un microscopio óptico con un aumento total de 100X empleando aceite de inmersión, realizando los siguientes conteos:

- Se determinó la proporción de EPC en 2000 eritrocitos totales.
- Se determinó la proporción de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) en 2000 EPC.
- Se consideraron los siguientes criterios para el conteo de los micronúcleos al microscopio:
 - a) Que fueran redondos.
 - b) Con un diámetro aproximado de 1/20 a 1/5 del diámetro del eritrocito.
 - c) Que se tiñeran de morado intenso.

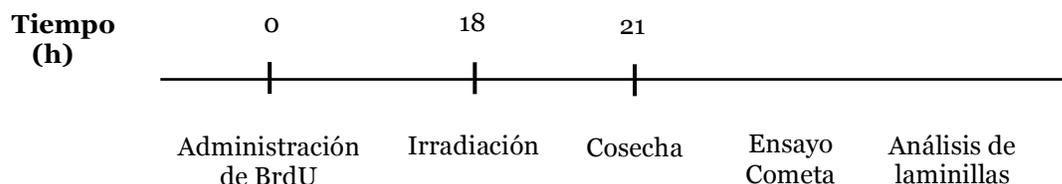
F) Análisis Estadístico

Para evaluar los daños genotóxico y citotóxico, se empleó la prueba estadística t pareada con un valor de $p < 0.05$. Cada ratón se comparó con su muestra inicial.

4.3 Línea Experimental. Medición del Daño al ADN debido a la Incorporación de Bajos Niveles de BrdU y a la acción de Radiación Gamma en Células de la Médula Ósea de Ratones in Vivo

A) Grupos de Trabajo

Protocolo



Se formaron 4 grupos, con 5 integrantes cada uno, como se indica a continuación.

Grupo	Tratamiento
I	Control
II	BrdU (0.12 mg/g PC)
III	Radiación (0.50 Gy)
IV	BrdU + Radiación (0.12 mg/g PC + 0.50 Gy)

B) Administración de BrdU

Los ratones de los grupos II y IV fueron inyectados con BrdU a una dosis de 0.125 mg/g de peso corporal (PC).

C) Irradiación

Los animales, mantenidos en un brete recibieron diferentes dosis absorbidas de radiación gamma proveniente de una fuente de cobalto 60 (Gammacel).

D) Cosecha y Obtención de Muestras

Al tiempo 21, se extrajo uno de los fémures de cada ratón y la médula ósea se colectó en un tubo eppendorf empleando como vehículo 1 ml de solución de Hanks. Se tomaron alícuotas de 7 y de 15 μ L y por duplicado y se aforó a 1ml con solución de Hanks. La suspensión celular obtenida se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min a 5 °C. Se mantuvieron las muestras en hielo y en la oscuridad.

E) Procedimiento para la Preparación de Laminillas, mediante el Ensayo de Electroforesis Unicelular en Gel

Ya con las células obtenidas, se procedió con el ensayo cometa conforme a la metodología mencionada en el apartado 4.1.5. En este caso, el análisis de la migración de ADN se realizó contando 100 células por ratón.

V. RESULTADOS

5.1 Línea Experimental. Determinación del daño radio-inducido al ADN de Leucocitos de Sangre Periférica debido a la Incorporación previa de BrdU

5.1.1 Recuento de Leucocitos

Los resultados obtenidos del Protocolo 4.1.1 (observar Tabla 5.1.), indican que la cantidad de leucocitos de sangre periférica para los ratones de la cepa Balb/c del bioterio del ININ, indican un ligero aumento con respecto a las cifras normales reportadas para esta cepa de ratón empleando líquido de Türk para su análisis son de $9.98 \pm 2.68 \times 10^3 / \mu\text{l}$ (Meredith, 2005).

Tabla 5.1. Conteos de granulocitos empleando las técnicas con líquido de Türk y con azul tripano, en ambos casos con un factor de dilución de 25.

Parámetro	Türk (leucocitos/ μl) $\times 10^3$	Azul Tripano (leucocitos/ μl) $\times 10^3$
Media	14.64	15.60
Desviación estándar	2.69	3.10
Rango	11.16-18.59	11.50-19.94
Tamaño de la muestra	22	22

5.1.2 Análisis de la Cinética del Filgrastim en Función del Aumento de Leucocitos Recientemente Diferenciados en Sangre Periférica

Se estandarizaron las condiciones de uso de Filgrastim, para incrementar la diferenciación de leucocitos en sangre periférica y favorecer la incorporación de BrdU. Empleando una dosis de 12 μg Filgrastim, se encontró que el efecto estimulador de granulocitos aumentó casi tres veces a partir del valor inicial de control a las 27 horas después de su administración, según lo indica la Figura 5.1.

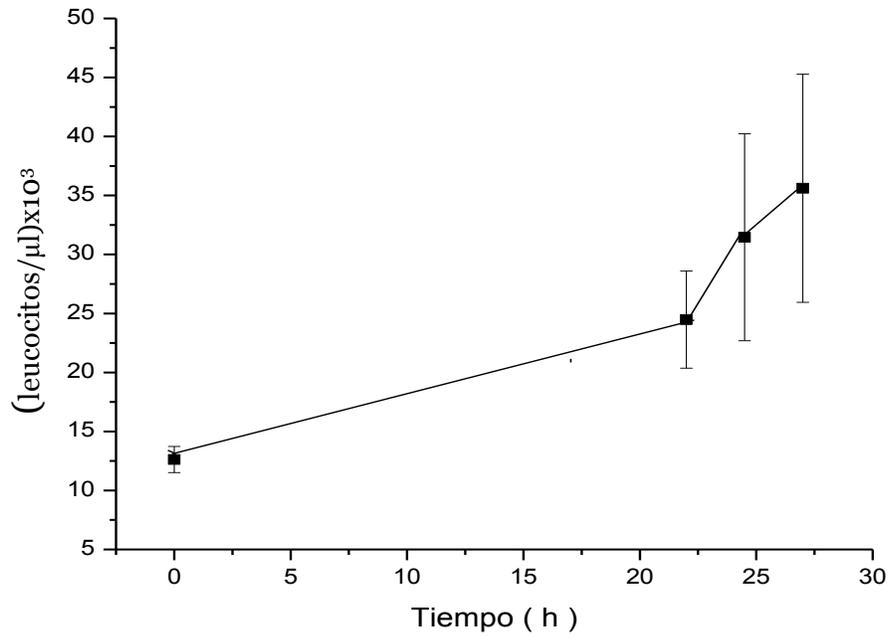


Figura 5.1. Aumento de la tasa de leucocitos recientemente diferenciados en sangre periférica empleando Filgrastim a una dosis única de 12 µg.

Un segundo experimento indicó que con dosis de 18 µg de Filgrastim se obtiene una mayor estimulación de leucocitos de sangre periférica a un tiempo de 27 h, según se observa en la Tabla 5.2. El hacer uso de estos resultados, facilitó la incorporación de BrdU en leucocitos de sangre periférica.

Tabla 5.2. Conteos de granulocitos empleando Filgrastim a diferentes dosis, mediante la técnica con líquido de Türk y cámara de Neubauer.

Dosis de Filgrastim (µg)	Ratón	(Leucocitos/µl)10 ³				Estimulación de Leucocitos (%) *	Promedio
		0 h	24 h	27 h	30 h		
12	1	15.38	15.75	23.38	11.06	52	39.50
	2	13.81	11.06	17.56	13.06	27	
18	1	17.56	18.94	49.56	42.38	182	143.50
	2	13.13	12.94	26.88	19.88	105	
25	1	22.88	17.81	26.56	17.38	16	92.00
	2	12.13	19.31	32.50	27.69	168	

*Conteo a las 27 h vs testigo

5.1.3 Determinación de la Incorporación de BrdU en Células de la Médula Ósea de Ratón

Con el propósito de establecer la dosis óptima de BrdU para su incorporación en leucocitos de sangre periférica, se halló la concentración efectiva media o CE_{50} para este agente en células de la médula ósea, la cual se refiere a la dosis de BrdU que afecta al 50% de las células y que no resulta altamente tóxica. Esto permitió determinar la incorporación de BrdU en las células teñidas con Hoechst 33258 y como se observa en la Tabla 5.3, la dosis de 0.75 μg BrdU /g de peso corporal representa la CE_{50} para las células de la médula ósea.

De acuerdo a la Figura 5.2, al teñir células de la médula ósea con Hoechst 33258 se pudieron distinguir a los núcleos grisáceos, los cuales incorporaron BrdU a una dosis de 0.75 mg/g de peso corporal, de los brillantes que no incorporaron a este agente.

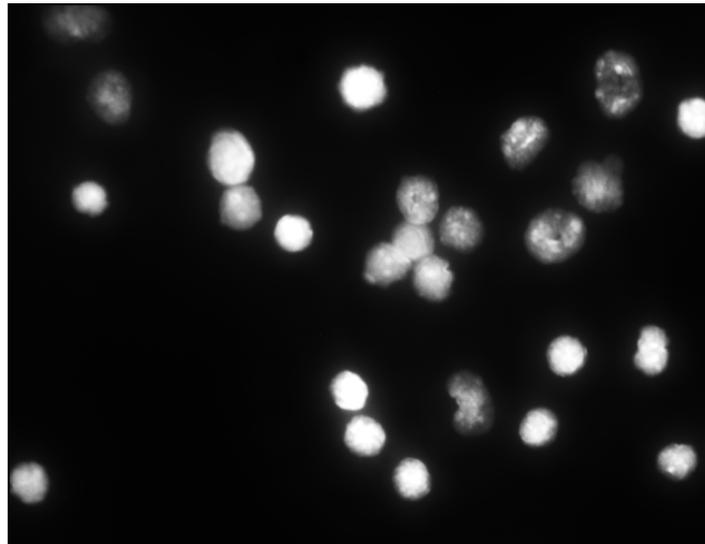


Figura 5.2. Micrografía de células de la médula ósea, teñidas con Hoechst 33258.

Tabla 5.3. Porcentaje de células de la médula ósea que incorporaron BrdU en función de la dosis y teñidas con Hoechst 33258.				
Grupo	Ratón	Dosis BrdU (mg/g P.C.)	Núcleos que incorporaron BrdU (%)	Promedio (%)
A	1	0.50	31.20	34.60
	2		38.00	
B	1	0.75	46.00	51.80
	2		57.00	
C	1	1.00	54.70	58.35
	2		62.00	
D	1	1.25	57.30	54.80
	2		52.30	

5.1.4 Determinación de la Incorporación de BrdU en Leucocitos de Sangre Periférica de Ratón

Una vez determinadas las dosis de Filgrastim y de BrdU óptimas y establecidas las técnicas para teñir las células tanto con Hoechst 33258 como con Anticuerpo Monoclonal anti-BrdU Conjugado con Alexa – flúor 488, se procedió conforme al Protocolo 4.1.4 para determinar la incorporación de BrdU en leucocitos de sangre periférica.

Como se indica en la Tabla 5.4, la BrdU a una dosis de 0.75 mg/g PC bloqueó la síntesis de ADN debido a su toxicidad, pese a la administración de Filgrastim, obteniendo una reducida población celular para su análisis. Por lo tanto, bajo estas condiciones no se pudo determinar la incorporación de BrdU y se prosiguió a realizar experimentos variando su dosis.

En muestras que emplearon Filgrastim a una dosis de 18 µg y BrdU a dosis de 0.20, 0.32, 0.63, 1.25 y 1.5 mg/g de PC, se realizó la tinción con Hoeschst 33258. Mientras que en otras muestras se empleó BrdU a razón de 0.25 mg/g de PC y fueron marcadas con anticuerpo monoclonal. Sin embargo, no fue posible determinar la incorporación de BrdU en leucocitos de sangre periférica, debido a que no se pudo adquirir un adecuado contraste en las imágenes por microscopia de fluorescencia. Como se observa en la Figura 5.3, no se pudo discriminar adecuadamente las

células que incorporaron BrdU. Por otra parte, para la mayoría de las dosis de BrdU empleadas, el tamaño de población celular fue menor a la requerida para un buen análisis.

Tabla 5.4. Porcentaje de cambio en la cantidad de leucocitos recientemente difereiados en sangre periférica, tratados con Filgrastim, BrdU y ambos agentes.

Grupo	Tratamiento	Ratón	(Leucocitos/ μ l) 10^3		Porcentaje de cambio de leucocitos (%)	Promedio
			0 h	27 h		
A	Filgrastim	1	11.56	27.56	238.38	221.67
		2	8.75	20.50	234.29	
		3	10.88	22.88	210.35	
B	BrdU	4	12.31	2.19	17.77	19.17
		5	13.69	2.75	20.09	
		6	10.81	2.13	19.65	
C	Filgrastim + BrdU	7	22.38	4.81	21.51	36.13
		8	12.75	5.25	41.18	
		9	9.44	4.31	45.70	

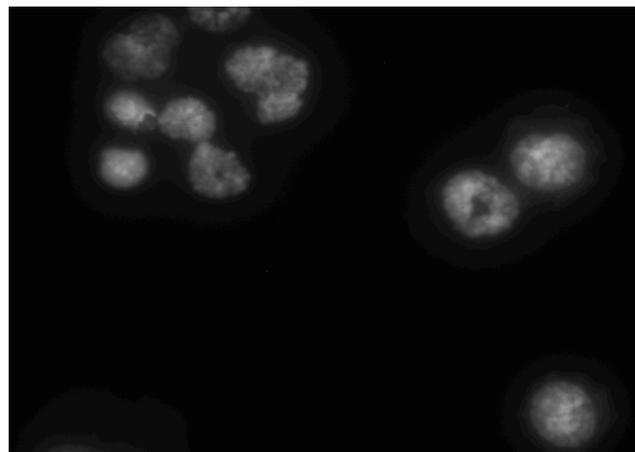


Figura 5.3. Micrografía de leucocitos de sangre periférica ósea, teñidas con Hoechst 33258.

5.2 Línea Experimental. Determinación de los Efectos Radiosensibilizadores Citotóxico y Genotóxico en Normoblastos debido a la Incorporación de BrdU

En la Tabla 5.5 se presentan los resultados derivados del Protocolo 4.2, en función de la frecuencia de eritrocitos policromáticos en 2000 eritrocitos obtenida para los 7 grupos formados con 5 ratones cada uno y tratados con tres diferentes dosis de BrdU y/o 0.5 Gy de radiación. El análisis muestra que existe una diferencia significativa en los grupos tratados con la combinación radiación y BrdU a las diferentes dosis. Esto indicó que el efecto citotóxico causado por la administración de BrdU, está relacionado con la dosis y que la incorporación de BrdU radiosensibiliza a este tipo de células.

Tabla 5.5. Efecto de la BrdU sobre la Citotoxicidad inducida por la exposición a radiación gamma, medida por frecuencia de EPC.				
Tratamiento	$\bar{x} \pm D.S.$	% Citotoxicidad (Tratado vs Control)	Citotoxicidad Teórica Rad+BrdU	IR
Radiación 0.50 Gy	38.8± 9.9	19.2		
Control	48.0±18.5			
BrdU 0.125 mg/g	56.4±20.6	9.0		
Control	62.0±12.8			
BrdU 0.25 mg/g	45.6±15.0	10.6		
Control	51.0±14.4			
BrdU 0.50 mg/g	32.4±18.2	36.7		
Control	51.2±23.6			
BrdU 0.125 mg/g + Rad 0.50 Gy	33.2± 8.3*	59.1	28.2	2.1
Control	81.2±14.7			
BrdU 0.25 mg/g + Rad 0.50 Gy	34.8±14.5*	51.7	29.8	1.7
Control	72.0±10.5			
BrdU 0.50 mg/g + Rad 0.50 Gy	19.6± 5.2*	68.8	55.9	1.2
Control	62.8±10.4			

*Estadísticamente significativo vs grupo testigo. Prueba t de Student $p < 0.05$.

IR, índice de resistencia = $d\text{BrdU-Rad} / d\text{BrdU} + d\text{Rad}$.

De manera similar, en la Tabla 5.6, se muestran las mediciones promedio de micronúcleos en 2000 eritrocitos policromáticos, empleando también el Protocolo 4.2. Este análisis, indica que existe una diferencia significativa entre los grupos tratados con únicamente radiación o con BrdU

a una dosis de 0.25 mg de BrdU por gramo de peso corporal y los grupos tratados con ambos radiación y BrdU a dosis de 0.125 y 0.5 mg por gramo de peso corporal.

Se observó que la BrdU con las tres dosis empleadas, bloqueó la división celular debido a su toxicidad y no permitió visualizar micronúcleos. Sólo para la dosis de 0.125 mg de BrdU por gramo de peso corporal, se observa un incremento de genotoxicidad mayor al mostrado al emplear sólo radiación, lo cual corrobora la toxicidad sobre el material genético del ratón debido a este agente.

Debido al daño letal causado por la BrdU, como se mencionó anteriormente, se le impide a la célula dividirse y expresar los efectos clastogénicos, que de otra manera serían visualizados como rupturas cromosómicas en forma de micronúcleos, como en el caso de células que sólo fueron irradiadas. Por lo que se decidió usar otra vía de aproximación al efecto sinérgico de la BrdU. Esta vez usando el análisis de las rupturas en el ADN usando el ensayo cometa en células de la médula ósea de ratones *in vivo*.

Tabla 5.6. Efecto de la BrdU sobre la sobre la Genotoxicidad inducida por la exposición a radiación gamma, medida por frecuencia de MN.		
Tratamiento	$\bar{x} \pm D.S.$	Incremento de Genotoxicidad, %
Radiación 0.5 Gy	26.2±12.3*	297.0
Control	6.6±1.5	
BrdU 0.125	2.6±1.5	0
Control	3.6±1.8	
BrdU 0.25	1.4±1.7*	0
Control	7.4±4.0	
BrdU 0.5	2.6±2.9	0
Control	5.4±3.4	
BrdU 0.125 Rad 0.5 Gy	16.8±7.6*	740.0
Control	2.0±2.3	
BrdU 0.25 Rad 0.5 Gy	9.2±9.4	155.6
Control	3.6±2.6	
BrdU 0.5 Rad 0.5 Gy	8.4±5.0*	250.00
Control	2.4±0.5	

*Estadísticamente significativo vs grupo testigo. Prueba t de Student $p < 0.05$

5.3 Línea Experimental. Medición del Daño al ADN debido a la acción de Radiación Gamma en Células de la Médula Ósea de Ratones in Vivo con su ADN sustituido con BrdU

El momento de la cauda es el indicador de daño al ADN más empleado el análisis de las laminillas obtenidas mediante electroforesis unicelular en gel. Éste es un índice producto del valor de migración por el contenido de ADN en la cauda y aunque no tiene un significado biológico, es muy empleado porque da una mayor sensibilidad a la metodología que otros índices, por ser el producto de dos índices de daño en el ADN. En las Figuras 5.4 y 5.5, se muestran las gráficas del promedio y error estándar del testigo para el momento de la cauda en células de la médula ósea y en linfocitos de sangre periférica.

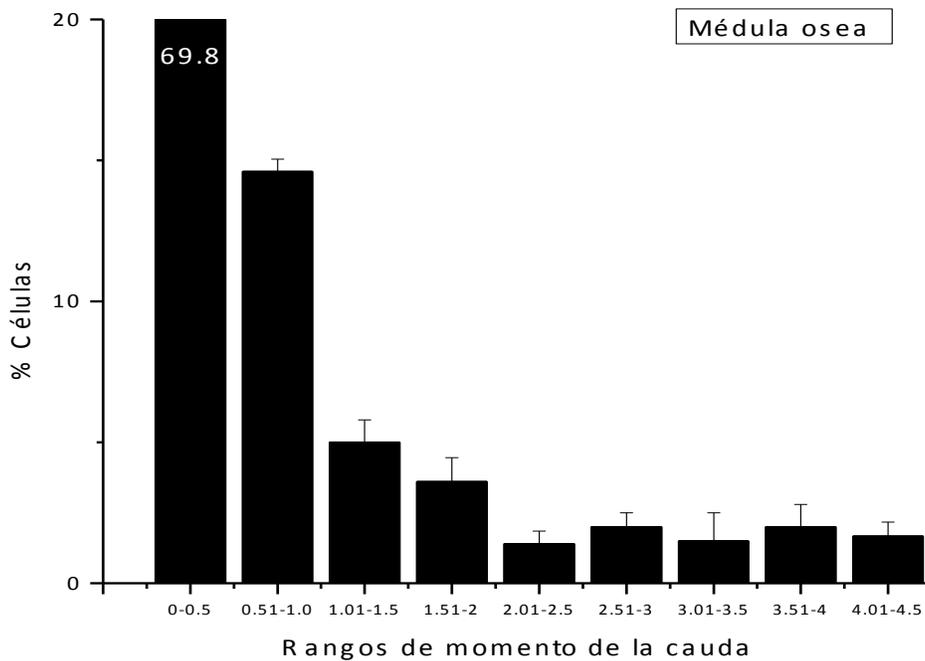


Figura 5.4. Histograma que indica el porcentaje de células de la médula ósea para cada rango de los momentos de la cauda, pertenecientes al grupo control.

Los datos indicaron que la mayoría de los leucocitos de sangre periférica se distribuyeron dentro de unos cuantos rangos de momentos de la cauda, de 0 a 2, mientras que poco más del 30 % de las células de la médula ósea muestran valores muy dispersos, alcanzando valores de momentos de la cauda hasta de 4.5. Estos valores tan altos se explican mediante los tamaños de caudas muy

largos que se encontraron durante el análisis de los mielocitos. Por este motivo, se eligió a la migración de la cauda en lugar del momento de la cauda por ser un indicador más conveniente para distinguir las rupturas de ADN.

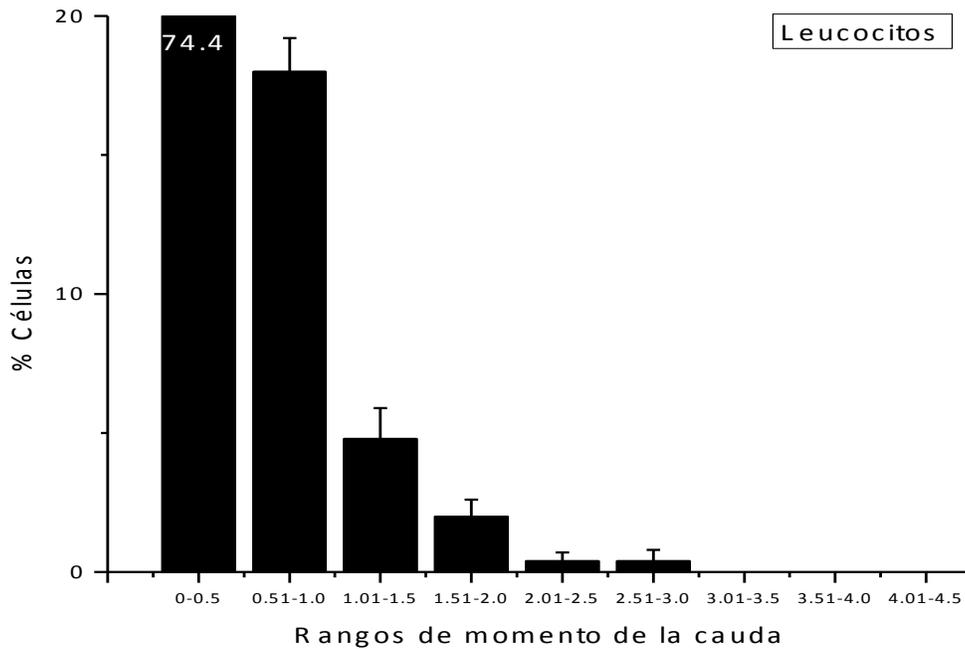


Figura 5.5. Histograma que indica el porcentaje de células de linfocitos de sangre periférica para cada rango de los momentos de la cauda, pertenecientes al grupo control.

Se formaron cuatro grupos con cinco integrantes cada uno y se obtuvieron células de la médula ósea. Para las células del grupo testigo, según lo indica la Figura 5.6, se pueden distinguir claramente las células que están en fase de síntesis de las que no lo están. El 75 % de las células presentaron valores de migración de la cauda dentro del rango de 0 a 20 μm ; las células alcanzaron valores de hasta 140 μm . En las células que no están en síntesis como los leucocitos, se ha observado que el 100% de las caudas tienen una longitud menor a 20 μm , por lo que se puede inferir que el 25% de las células de la médula ósea están en fase de síntesis. La mayor parte de las células en síntesis tienen caudas entre 60 y 100 μm .

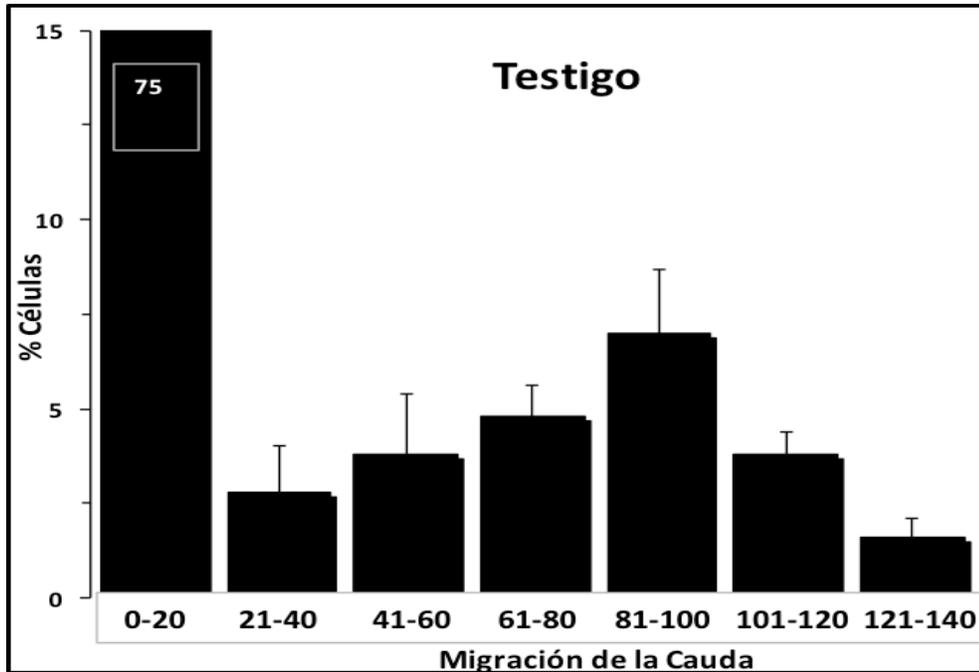


Figura 5.6. Histograma que indica el porcentaje de células de la médula ósea para cada rango de migración de la cauda, pertenecientes al grupo control. El 75% de las células no presentaron daño.

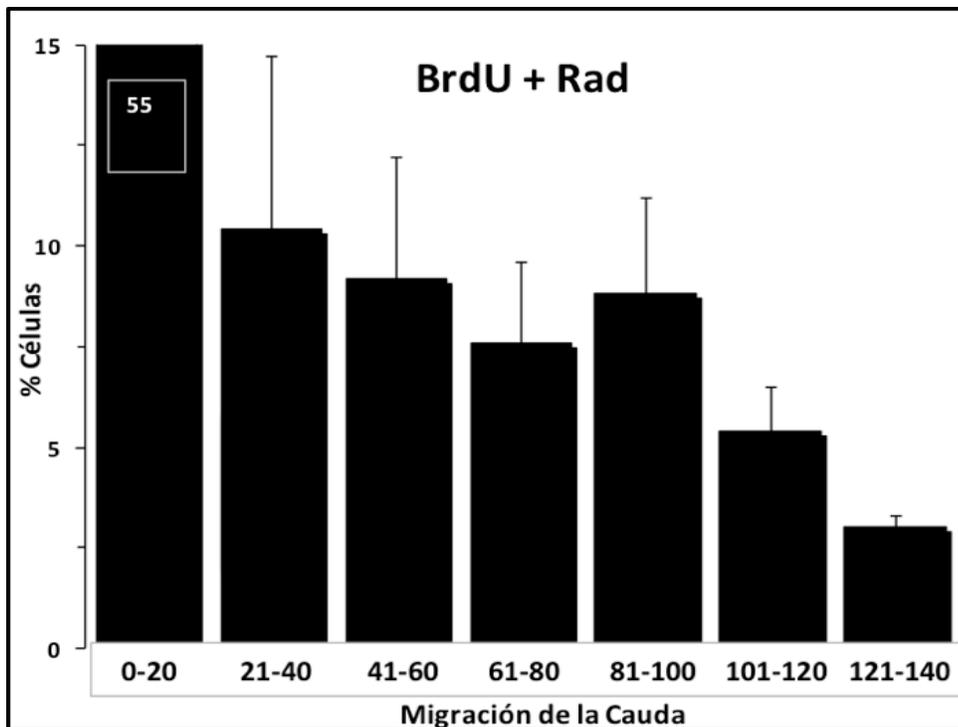


Figura 5.7. Histograma que indica el porcentaje de células de la médula ósea para cada rango de migración de la cauda, pertenecientes al grupo tratado con BrdU y radiación, en el tiempo 21. El 55% de las células no presentaron daño.

En el caso de las células que incorporaron BrdU y posteriormente fueron tratadas con radiación, como se muestra en la Figura 5.7, exhibieron un patrón muy diferente, se obtuvo un buen efecto radiosensibilizador de la BrdU en función del incremento de daño al ADN. De acuerdo con las Figuras 5.8 y 5.9, en los grupos tratados sólo a BrdU o con radiación gamma, no se pudo distinguir los efectos de la incorporación de la BrdU de la sensibilización causada por la radiación, en términos de la inducción de rupturas y de la inhibición de la síntesis de ADN.

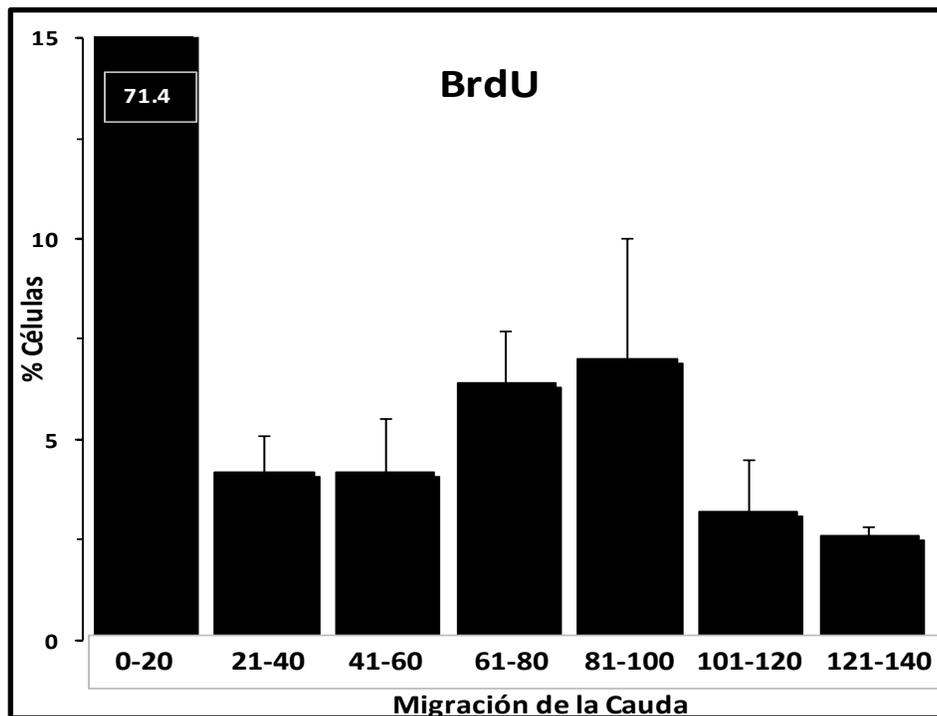


Figura 5.8. Histograma que indica el porcentaje de células de la médula ósea para cada rango de migración de la cauda, pertenecientes al grupo tratado con BrdU, en el tiempo 21. El 71.4 % de las células no presentaron daño.

En la Tabla 5.7. se muestra la comparación global del porcentaje de células con migración de la cauda mayor a 20 μm en las células de la médula ósea control o tratadas con BrdU, radiación o ambas. En el grupo testigo estas células comprenden alrededor del 25%, las tratadas con BrdU o con radiación, 27% y 29% respectivamente, estas pequeñas diferencias de 1.8 y 4.0 con respecto al control no fueron estadísticamente significativas. En cambio el grupo tratado con ambos agentes

presentó una frecuencia del 45%, es decir una diferencia de 20% la que si resultó estadísticamente significativa.

Para calcular el índice de radiosensibilización se dividió el incremento en el porcentaje de células con migración mayor a 20 µm en el grupo tratado con ambos agentes, entre la suma de los porcentajes de células con migración mayor a 20 µm de los grupos tratados con BrdU o con radiación. El índice de radiosensibilización fue de 2.6. Lo que indica claramente que la incorporación de BrdU radiosensibiliza a la célula a la inducción de rupturas por radiación ionizante.

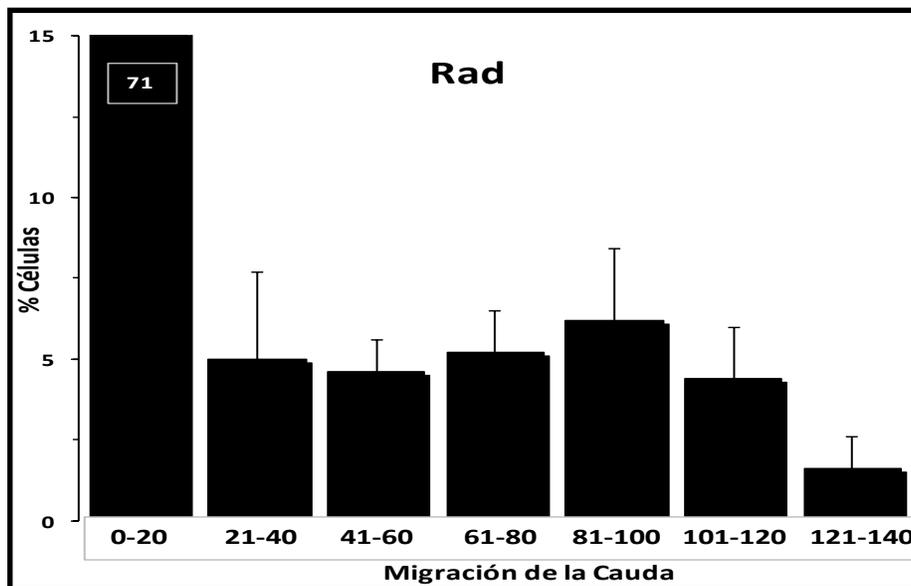


Figura 5.9. Histograma que indica el porcentaje de células de la médula ósea para cada rango de migración de la cauda, pertenecientes al grupo tratado con radiación gamma, en el tiempo 21. El 71% de las células no presentaron daño.

Tratamiento	% Células con MC > 20 µm $\bar{x} \pm D.S.$	Diferencia vs control	IR
Testigo	24.8 ± 5.3		
BrdU (0.125 mg/kg)	28.6 ± 7.5	3.8	
Rad (0.5 Gy)	28.8 ± 12.5	4.0	
BrdU-Rad	45 ± 17.7*	20.2	2.6

MC migración de la cauda. IR índice de resistencia = $d\text{BrdU-Rad} / d\text{BrdU} + d\text{Rad}$;

* Estadísticamente significativo vs grupo testigo. Prueba t de Student $p < 0.05$

VI. DISCUSIÓN

El presente estudio muestra que la incorporación de la BrdU al ADN incrementa el efecto citotóxico y las propiedades clastogénicas en las células expuestas a radiación ionizante en concordancia con estudios previos (Iliakis G., 1989; Morales-Ramírez P., 1983). Se ha demostrado que el daño inducido por la radiación es mayor en sitios BrdU-sustituídos de cadena sencilla, generados por un error de apareamiento, que en las de cadena doble (Cecchini S., 2005).

Estudios previos sobre la radiosensibilización de ADN inducida por BrdU, señalan como relevante la participación del átomo de bromo en este efecto. La pérdida de bromo causada por la irradiación de las células, es menor en el ADN de cadena doble en comparación con el de cadena sencilla (Cecchini S., 2004). Posteriormente, se obtuvieron pruebas de que la BrdU se relaciona con la formación de enlaces cruzados intracatenarios localizados principalmente en una región del ADN que contiene protuberancias y está formada por cinco bases no apareadas. Estos autores propusieron que los efectos de la radiosensibilización de la bromodesoxiuridina *in vivo*, prácticamente se limitan a regiones de una sola hebra, como las encontradas en las burbujas de transcripción, en las horquillas de replicación, en el ADN no apareado y posiblemente en los bucles de telomeres (Cecchini S., 2005).

Se han obtenido pruebas adicionales que confirman que los enlaces cruzados y las rupturas de las cadenas se producen principalmente en el modelo B del ADN, en forma biológicamente importante (Dextraze ME., 2007). Los enlaces cruzados son generados en regiones BrdU-sustituídas de hebra sencilla, por acción de la radiación lo que puede ocasionar lesiones letales. La sustitución de la timidina por la BrdU se relaciona con cambios conformacionales en el ADN sustituido, así como con la asociación de la cadena a diversas proteínas. Un incremento de aberraciones cromosómicas, la inducción de rupturas de doble cadena y la inestabilidad de la cromatina, se han observado en células sensibilizadas con BrdU (Iliakis, G., 1989).

En una investigación previa, se midió el efecto de BrdU sobre la inducción de micronúcleos por un radiofármaco *in vivo* (Morales-Ávila E., 2010), se encontró que la BrdU causaba un aumento en la citotoxicidad. Paradójicamente, también se redujo la cantidad de micronúcleos inducidos por la radiación; esto debido a que las células eritropoyéticas en la médula ósea están continuamente dividiendo y produciendo regiones de una sola hebra durante la división del ADN sustituido con BrdU. Este proceso produce lesiones letales que no permiten la división celular o la inducción de micronúcleos. Por lo anterior, se planteó hacer el estudio de la radiosensibilización de la BrdU mediante la inducción de micronúcleos en normoblastos de ratón *in vivo*, midiendo la inducción de eritrocitos policromáticos micronucleados en sangre periférica de ratón.

En este estudio, se observó que la incorporación de BrdU al genoma celular, aumentó sinérgicamente la frecuencia de roturas de ADN que son inducidas por radiación gamma, pero no aumentó el efecto de inhibición de la duplicación del ADN provocado por la radiación.

La finalidad del presente estudio es desarrollar las bases de una posible estrategia de la ablación de la médula ósea, usando la combinación de BrdU con un radiofármaco que se incorpore al hueso, determinando el efecto de la incorporación de BrdU sobre la inducción de rupturas al ADN por radiación.

VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1 Línea Experimental. Determinación del daño radio-inducido al ADN de Leucocitos de Sangre Periférica debido a la Incorporación previa de BrdU

- Pese a que se obtuvo una buena estimulación de leucocitos de sangre periférica empleando Filgrastim, no hubo manera de distinguir las células que incorporaron BrdU de las que no lo hicieron. Esto debido a la toxicidad de la BrdU y al mal contraste de las imágenes.
- Por la relativa novedad que representa el estudio del efecto radiosensibilizador debido a la incorporación de BrdU en leucocitos de sangre periférica, se sugiere como una de las futuras líneas de investigación el experimentar con otros estimuladores de colonias de granulocitos y encontrar alternativas de tinción de las células, para la mejor detección de las células con daño al ADN por este agente.

7.2 Línea Experimental. Determinación de los efectos Radiosensibilizadores Citotóxico y Genotóxico en Normoblastos debido a la Incorporación de BrdU

- El efecto citotóxico de la BrdU fue tal que inhibió el efecto de la radiación, por lo que no se observó un efecto sensibilizador en eritrocitos de ratones *in vivo*. Los resultados indican un efecto citotóxico sinérgico que disminuye al aumentar la dosis de BrdU.
- La toxicidad de la BrdU a las dosis empleadas, fue tal que no permitió realizar un análisis adecuado de genotoxicidad en los eritrocitos.
- Sería interesante experimentar con dosis de BrdU diferentes a las utilizadas en este trabajo de investigación, para encontrar las mejores condiciones para la medición del daño al ADN por la incorporación de BrdU en normoblastos.

7.3 Línea Experimental. Medición del Daño al ADN debido a la acción de Radiación Gamma en Células de la Médula Ósea de Ratones *in vivo* con su ADN sustituido con BrdU

- La BrdU a bajas dosis tiene un efecto sinérgico sobre el efecto citotóxico de la radiación gamma, en las células de la médula ósea.
- El poder determinar el efecto de la incorporación de BrdU sobre la inducción de rupturas al ADN por radiación, permitiría usar este modelo para sentar las bases de una posible estrategia de la ablación de la médula ósea, usando la combinación de BrdU con un radiofármaco que se incorpore al hueso.

VIII. REFERENCIAS

1. Appelbaum F., Badger C., Bernstein I., Buckner C., Deeg H., Eary J., Matthews D., Press O., Storb R., Thomas E. Is there a Better Way to Deliver Total Body Irradiation? *Biol. Bone Marrow Transplant*, 10 (1992) 77-81.
2. Attix F. *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. 1a. ed., Wiley (1986).
3. Cecchini S., Girouard S., Huels MA., Sanche L., Hunting DJ. Single-strand specific radiosensitization of DNA by bromodeoxyuridine. *Biochemistry*, 162 (2004) 604-615.
4. Cecchini S., Masson C., La Madeleine C., Huels MA., Sanche L., Wagner JR., Hunting DJ. Interstrand cross-link induction by UV radiation in bromodeoxyuridine-substituted DNA: dependence on DNA conformation. *Biochemistry*, 44 (2005) 16957-66.
5. Crockart N., Radermacher K., Jordan B., Baudelet C., Cron G., Grégoire V., Beghein N., Bouzin C., Feron O. Gallez B. Tumor Radiosensitization by Antiinflammatory Drugs: Evidence for a New Mechanism involving the Oxygen Effect. *Cancer Res.*, 1 (2005) 7911-6.
6. Dextraze ME., Wagner JR, Hunting DJ. 5-Bromodeoxyuridine radiosensitization: conformation-dependent DNA damage. *Biochemistry*, 46 (2007) 9089.
7. El IMSS en Cifras: los Tumores Malignos en la Población Derechohabiente. *Rev. Méd. IMSS*, 43 (2005) 349-35.
8. Erickson R., Szybalski W. *Molecular Radiobiology of Human Cell Lines: V. Comparative radiosensitizing properties of 5-halodeoxycytidines and 5-halode-oxypyrimidines*. *Radiat. Res.*, 20 (1963) 252-262.
9. Fan J., Kodama E., Koh Y. Halogenated Thymidine Analogues Restore the Expression of Silenced Genes without Demethylation. *Cancer Res.*, 65 (2005) 6927-6933.
10. Hall E. J., Giaccia A. J. *Radiobiology for the Radiologist*. 6a. ed., Lippincott Wilkins & Williams (2006).
11. Iliakis G., Kurtzman S., Pantelias G., Okayasu R. Mechanism of Radiosensitization by Halogenated Pyrimidines: Effect of BrdU on Radiation Induction of DNA and Chromosome Damage and its Correlation with Cell Killing. *Int. J. Radiat. Res.*, 119 (1989) 286-304.
12. INEGI. *Estadísticas del 2012*.
13. Kalia V., Devi N. Differential Modification of Radiation Damage in 5-bromo-2-deoxy-uridine Sensitized Human Glioma Cells and PHA-stimulated Peripheral Leukocytes by 2-deoxy-D-glucose. *Indian J. Exp. Biol.*, 32 (1994) 637-42.

14. Krause W., Jordan A., Ssholz R., Martin J.L. Iodinated Nitroimidazoles as Radiosensitizers. *Anticancer Res.*, 25 (2005) 2145-2152.
15. Lawrence T.S., Davis M.A., Stetson P.L., Maybaum J., Ensminger W.D. Kinetics of bromodeoxyuridine elimination from human colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, 11 (1994) 2964-8.
16. Mendiola-Cruz M., Morales-Ramírez P. Repair Kinetics of Gamma-ray Induced DNA Damage Determined by the Single Cell Gel Electrophoresis Assay in Murine Leukocytes *in vivo*. *Mutat. Res.*, 433 (1999) 45-52.
17. Meredith EL., Chamba A., Holder MJ., Barnes NM., Gordon J. Close encounters of the monoamine kind: immune cells betray their nervous disposition. *Immunology*, 115 (2005) 289-95.
18. Morales-Ávila E, Ferro-Flores G, Vallarino-Kelly T and Morales-Ramírez P. Effect of BrdU incorporation into DNA on genotoxic and cytotoxic action of bone seeker radiopharmaceutical (153Sm-EDTMP) in murine bone marrow cells *in vivo*. *Radiation Res*, 173 (2010) 386-391.
19. Morales-Ramirez P. Analysis *in vivo* of Sister-Chromatid Exchange in Mouse Bone-Marrow and Salivary-Gland Cells. *Mutat. Res.*, 74 (1980) 61-9.
20. Morales-Ramírez P., Vallarino-Kelly T., Mercader-Martínez J., Rodríguez-Reyes R. Induction of Micronuclei by Acute and Chronic Exposure *in vivo* to Gamma rays in Murine Polychromatic Erythrocytes. *Mutat. Res.*, 341 (1994) 47-55.
21. Morales-Avila E., Ferro-Flores G., Vallarino-Kelly T., Morales-Ramírez P. Radiosensitization of Murine Normoblasts *in vivo* by Bromodeoxyuridine to the Genotoxicity and Cytotoxicity of the Bone-Seeking Radiopharmaceutical 153Sm-EDTMP. *Radiat. Res.*, 173 (2010) 386-91.
22. OMS. Estadísticas Sanitarias Mundiales, (2012).
23. Peoples A. R., Lee J., Weinfeld M., Milligan J.R., Bernhard W. A. Yields of Damage to C40 Deoxyribose and to Pyrimidines in pUC18 by the Direct Effect of Ionizing Radiation. *Nucleic Acids Res.*, 29 (2012) 1–10.
24. Powathil G., Kohandel M., Milosevic M., Sivaloganathan S. Modeling the Spatial Distribution of Chronic Tumor Hypoxia: Implications for Experimental and Clinical Studies. *J. N Computational & Mathematical Methods in Medicine*, 19 (2012) 1-11.
25. Russo A., Gianni L., Kinsella T.J., Klecker R.W., Jenkins J, Rowland J, Glatstein E, Mitchell JB, Collins J, Myers C. Pharmacological evaluation of intravenous delivery of 5-bromodeoxyuridine to patients with brain tumors. *Cancer Res.*, 4 (1984) 1702-5.
26. Schmid W. The Micronucleus. *Mutat. Res.*, 31 (1975) 9-15.

27. Singh N., McCoy M., Tice R., Schneider E. A Simple Technique for Quantification of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp. Cell Res.*, 175 (1988) 184-191.
28. Sterpone S., Cozziins C. Influence of XRCC1 Genetic Polymorphisms on Ionizing Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J. Nucleic Acids*, 69 (2010) 1-5.
29. Taupin P. BrdU Immunohistochemistry for Studying Adult Neurogenesis: Paradigms, Pitfalls, Limitations, and Validation. *J. Brain. Res.*, 53 (2006) 198–214.
30. Tice R., Andrews P., Singh P. The Single Cell Gel Assay: a Sensitive Technique for Evaluating Intercellular Differences in DNA Damage and Repair. *Environ. Mol. Mutagen.*, 288 (1990) 47-63.
31. Turner J. Interaction of Ionizing Radiation with Matter. *Health Phys. J.*, 88 (2005) 520-544.
32. Varshney R., Gupta S., Dwarakanath B. Radiosensitization of Murine Ehrlich Ascites Tumor by Combination of 2-deoxy-D-glucose and 6-aminonicotinamide. *Technology Cancer Res. & Treatment*, 3 (2004) 659-63.
33. Wardman P. Chemical Radiosensitizers for use in Radiotherapy. *J. Clin. Oncol.*, 19 (2007) 397-417.
34. Watanabe R., Nikjoo H. Modelling the Effect of Incorporated Halogenated Pyrimidine on Radiation-Induced DNA Strand Breaks. *Int. J. Radiat. Biol.*, 78 (2001) 953-966.
35. Weichelbaum R. R., Epstein J., Little J. B., Kornblith P. Inherent Cellular Radiosensitivity of Human Tumors of Varying Clinical Curability. *AJR Am J Roentgenol*, 127 (1976) 1027-32.
36. Zaucha R., Buckner D., Barnett T. Modified Total Body Irradiation as a Planned Second High-Dose Therapy with Stem Cell Infusion for Patients with Bone-based Malignancies. *Int. J. Radiat. Oncol Biol. Phys.*, 64 (2006) 227–34.