



Universidad Autónoma de Zacatecas

*"Francisco García Salinas"*

Unidad Académica de Estudios Nucleares  
Maestría en Ciencias Nucleares



# **Rayos X provenientes de equipos odontológicos inducen cambios en la expresión de Hsp70, p53, caspasa-8 y caspasa-3 y/o muerte celular por apoptosis en leucocitos humanos**

**Tesis en cumplimiento parcial de los requisitos para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencias Nucleares con orientación en Medicina Nuclear**

**PRESENTA:**

**Q.F.B Jennifer Ortiz Letechipia**

**Directores:**

Dr. Consuelo Letechipía de León (UAEN-UAZ)

Dr. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez (UACB-UAZ)

Dr. Héctor Rene Vega Carrillo (UAEN-UAZ)

**Zacatecas, Zac. Agosto 2019**



Consortio de  
Universidades  
Mexicanas

Asunto: Asignación de tema de tesis

Q.F.B. Jennifer Ortiz Letechipía  
Alumna MCN  
Presente

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


Con esta fecha, se reunieron las señoras Dra. Consuelo Letechipía de León y Dra. Sonia Azucena Saucedo Anaya, Responsable del Programa de Posgrado de la UAEN y estuvieron acordes en fijar a usted el siguiente

TEMA

**“Rayos X provenientes de equipos odontológicos inducen cambios en la expresión de Hsp70, p53, caspasa-8 y caspasa-3 y/o muerte celular por apoptosis en leucocitos humanos ”**

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

ATENTAMENTE  
Zacatecas, Zac., a 17 de junio del 2019

  
Dra. Sonia Azucena Saucedo Anaya  
Responsable de Posgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS "FRANCISCO GARCÍA SALINAS"

UNIDAD ACADÉMICA DE ESTUDIOS NUCLEARES

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



Of. No. 359/19

Zacatecas, Zac., 12 de agosto de 2019

**Q.F.B Jennifer Ortiz Letechipía**  
**Presente**

La Unidad Académica de Estudios Nucleares de la Universidad Autónoma de Zacatecas a través del Programa de Maestría en Ciencias Nucleares, comunica a Usted que la Comisión revisora integrada por:

Dra. Consuelo Letechipía de León  
Dr. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez  
Dr. Héctor René Vega Carrillo  
Dr. Valentín Badillo Almaraz  
M. en C. Víctor Martín Hernández Dávila

Revisó y aprobó el trabajo de tesis **“Rayos X provenientes de equipos odontológicos inducen cambios en la expresión de Hsp70, p53, caspasa-8 y caspasa-3 y/o muerte celular por apoptosis en leucocitos humanos ”**

Por lo que está usted facultada por esta Unidad Académica para imprimirlo y realizar los trámites necesarios ante la Rectoría de la Universidad Autónoma de Zacatecas, para realización de su Examen de Grado.

Atentamente

Dra. Sonia Azucena Saucedo Anaya  
Responsable de Posgrado UAEN



**Rayos X provenientes de equipos odontológicos inducen cambios en la expresión de Hsp70, p53 caspasa-8 y caspasa-3 y/o muerte celular por apoptosis en leucocitos humanos**

Aprobada por el jurado:

---

Dra. Consuelo Letechipía de León

---

Dr. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez

---

Dr. Héctor René Vega Carrillo

---

Dr. Valentín Badillo Almaraz

---

Dr. Eduardo Medrano Cortés

## **Dedicatoria**

A Dios, por darme la vida y la oportunidad de concluir esta etapa de mi formación académica.

A mis padres, por su amor, por su apoyo incondicional, por creer en mí, por su trabajo y sacrificio todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí.

A mi hermana por su cariño y por estar siempre presente animándome a seguir adelante.

## **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por contribuir a la realización de este trabajo a través del apoyo No. 853467. A la Universidad Autónoma de Zacatecas y la Unidad Académica de Estudios Nucleares por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

A la Dra. en C. Consuelo Letechipía de León por todo el apoyo para trabajar en este proyecto de maestría, así como también al Dr. en C. Héctor René Vega Carrillo por brindarme su asesoría en el proyecto. Al Dr. en C. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez, a su equipo de trabajo M. en C. Rosa Gabriela Reveles Hernández y M. en C. David Alejandro García López por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de biología celular y neurobiología, así como también por su confianza, apoyo, asistencia y amabilidad a lo largo de mi formación académica. Al Dr. en I. E. Eduardo Medrano Cortés por mantener el equipo de rayos X disponible para este proyecto.

A los alumnos del servicio social Alejandra Goretti Meza Hernández, Néstor Omar Macías Salas, Víctor David Alonso Jiménez, Víctor Manuel Moreno Escareño y Juan Eduardo Ramos por su asistencia durante el desarrollo experimental.

A Néstor Omar Macías Salas, Luis Martín García Ortiz, Diego Alberto Dávila López, Paola Romo Letechipia, Víctor Manuel Moreno Escareño y Kevin Said Ramírez Dávila por su disponibilidad para ser donadores en este proyecto.

Finalmente agradezco a toda mi familia, mis amigos y a mis compañeros por su apoyo siempre.

Q.F.B Jennifer Ortiz Letechipia  
Agosto 2019

## RESUMEN

Los rayos X son utilizados en consultorios odontológicos con fines de diagnóstico, donde el POE recibe dosis de exposición ocasionando un daño estocástico que comúnmente no es considerado, pero es acumulable. Por lo anterior, se ha reportado una relación entre leucopenia y exposición a radiación ionizante, de tal manera que los leucocitos son un modelo biológico idóneo. El daño celular se manifiesta a través de expresión de bioindicadores como Hsp70 o con muerte celular, proceso que debe ser estudiado para ver el grado de tolerancia homeostática con diferentes grados de radiación. El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios en la expresión de las proteínas Hsp70, p53, caspasa-8 y caspasa-3 y/o muerte celular por apoptosis en leucocitos humanos expuestos a rayos X provenientes de equipos odontológicos. Leucocitos en sangre total fueron expuestos a dosis diferentes de rayos X. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular mediante tinción Wright. Seguido a esto se procedió a identificar las proteínas Hsp70, p53, caspasa-8 y caspasa-3 por Western-blot. Se observó una disminución de células vivas de 97.5% a 39.5% respecto a las diferentes dosis de exposición. El comportamiento de Hsp70 y caspasa-8 fue similar, de tal manera que para la tercera dosis la expresión incrementó y para la dosis más alta esta disminuye. La proteína p53 incrementó su expresión en la primera dosis para luego disminuir en las siguientes. La expresión de caspasa-3 para cada dosis fue incrementando. El porcentaje de muerte celular fue dependiente de la dosis de exposición. Los datos obtenidos determinan que Hsp70 es un bioindicador de estrés celular, mientras que p53, caspasa-8 y caspasa-3 son bioindicadores de apoptosis. El daño celular de los leucocitos expuestos a rayos X, provee información relevante para implementar mecanismos de protección en el área de seguridad radiológica.

**Palabras clave:** Leucocitos, rayos X, Hsp70, p53, caspasa-8, caspasa-3 y apoptosis.

## ABSTRACT

X-rays are used in dental offices for diagnostic purposes, where the POE receives a dose of exposure that causes a stochastic damage that is not report, but is cumulative. Therefore, a relationship between leukopenia and exposure to ionizing radiation has been reported, in such a way that leukocytes are an ideal biological model. Cell damage is manifested through the expression of bioindicators such as Hsp70 or cell death, process that must be studied for the degree of homeostatic tolerance with different degrees of radiation. The aim of this work was to evaluate the changes in the expression of proteins Hsp70, p53, caspase-8 and caspase-3 and / or cell death by apoptosis in human leukocytes exposed to X-rays from dental equipment. Leukocytes in whole blood were exposed at different doses of X-rays. Subsequently, cell viability was assessed by Wright's stain. Following this, the proteins Hsp70, p53, caspase-8 and caspase-3 were identified by Western-blot. A decrease of living cells from 97.5% to 39.5% was observed with respect to the different exposure doses. The behavior of Hsp70 and caspase-8 was similar, in such a way that for the third dose the expression increased and for the highest dose it decreases. The p53 protein increased its expression in the first dose and then decreased in the following ones. The expression of caspase-3 for each dose increased. The percentage of cell death was dependent on the dose of exposure. The data obtained determine that Hsp70 is a bioindicator of cellular stress, while p53, caspase-8 and caspase-3 are bioindicators of apoptosis. The cellular damage of leukocytes exposed to X-rays, provides relevant information to implement protection mechanisms in the area of radiological safety.

**Keywords:** Leukocytes, X rays, Hsp70, p53, caspase-8, caspase-3 and apoptosis.



# ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT .....	vii
ÍNDICE GENERAL .....	viii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tablas .....	xii
I INTRODUCCIÓN .....	1
Pregunta de Investigación.....	5
Hipótesis.....	5
Objetivo general .....	5
Objetivos específicos .....	5
II REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1. Rayos X .....	6
2.1.1. Magnitudes y unidades dosimétricas.....	8
2.1.2. Efectos de los rayos X sobre los organismos biológicos .....	9
2.2. Leucocitos .....	12
2.3. Apoptosis.....	15
2.4. Proteínas celulares.....	17
2.5. Biomarcadores en la radiación ionizante .....	18
2.5.1. Proteínas de choque térmico .....	20
2.5.1.1. Hsp70.....	21
2.5.2. p53 .....	22
2.5.3. Caspasa-8.....	23
2.5.4. Caspasa-3.....	24

III MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
3.1. Selección y número de muestras .....	26
3.2. Exposición de leucocitos .....	26
3.2.1. Rayos X.....	26
3.2.1.1. Determinación de la dosis absorbida .....	27
3.3. Evaluación de la viabilidad celular (Leucocitos en sangre total) .....	29
3.4. Identificación de bioindicadores (Hsp 70, Hsp 90, p53 y capasa-3).....	29
3.4.1. Lisis celular .....	29
3.4.2. Cuantificación de proteínas totales.....	29
3.4.3. Western Blot.....	30
3.5. Identificación de cambios morfológicos celulares post-estrés.....	32
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
4.1. Evaluación de la viabilidad celular .....	33
4.2. Identificación de bioindicadores (Hsp70, p53, caspasa-8 y caspasa-3)..	34
4.2.1. Cuantificación de proteínas totales .....	34
4.2.2. Western-blot .....	34
4.2.2.1.Hsp70 .....	34
4.2.2.2.p53.....	35
4.2.2.3.Caspasa-8 .....	36
4.2.2.4.Caspasa-3 .....	37
4.3. Evaluación morfológica celular .....	38
4.3.1. Controles .....	38
4.3.1.1.Leucocitos con morfología normal.....	38
4.3.2. Rayos X .....	39
V CONCLUSIONES .....	42
Trabajo a Futuro.....	44
REFERENCIAS.....	45

ANEXOS.....	52
CURRICULUM VITAE.....	59

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema de la producción de rayos X en un tubo convencional.....	7
<b>Figura 2.</b> Espectro de los rayos X respecto al voltaje del tubo. ....	8
<b>Figura 3.</b> Interacción de los rayos X con la materia. ....	10
<b>Figura 4.</b> Radiólisis del agua. ....	11
<b>Figura 5.</b> Tipos de leucocitos .....	13
<b>Figura 6.</b> Fases de la apoptosis. ....	16
<b>Figura 7.</b> Vías de la apoptosis.....	17
<b>Figura 8.</b> El papel de p53 en la apoptosis.....	23
<b>Figura 9.</b> Cascada de caspasas en la apoptosis. ....	24
<b>Figura 10.</b> Equipo de rayos X odontológicos. ....	27
<b>Figura 11.</b> Protocolo de irradiación para cada una de las muestras. ....	27
<b>Figura 12.</b> Electroforesis de proteínas en gel SDS-PAGE.....	30
<b>Figura 13.</b> Proteínas teñidas con rojo Ponceau en la membrana de nitrocelulosa. .....	31
<b>Figura 14.</b> Incubación para la inmunodetección de las membranas de nitrocelulosa. ....	32
<b>Figura 15.</b> Viabilidad celular respecto a la dosis absorbida.....	33
<b>Figura 16.</b> Curva de calibración Bradford. ....	34
<b>Figura 17.</b> Expresión de Hsp70 en Western blot revelado con diaminobenzidina y control de $\beta$ -Tubulina revelado con ECL.....	35
<b>Figura 18.</b> Expresión de p53 por Western-blot y control de $\beta$ -Tubulina revelado con ECL.....	36
<b>Figura 19.</b> Expresión de caspasa-8 en Western blot revelado con diaminobenzidina y control de $\beta$ -Tubulina revelado con ECL. ....	37
<b>Figura 20.</b> Expresión de caspasa-3 y control de $\beta$ -Tubulina por Western-blot revelado con ECL.....	37
<b>Figura 21.</b> Leucocitos control. ....	38
<b>Figura 22.</b> Leucocitos expuestos a la primera dosis. ....	39
<b>Figura 23.</b> Leucocitos expuestos a la segunda dosis. ....	40
<b>Figura 24.</b> Leucocitos expuestos a la tercera dosis.....	40
<b>Figura 25.</b> Leucocitos expuestos a la cuarta dosis. ....	41

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Leucocitos y sus características.....	13
<b>Tabla 2.</b> Dosis en función de los disparos realizados. ....	28

# I INTRODUCCIÓN

La radiación se puede clasificar como no ionizante o ionizante (en esta categoría se clasifican los rayos X). Los seres humanos estamos permanentemente expuestos a un nivel de radiación natural (ionizante y no ionizante); en el caso de la radiación ionizante el origen es la radiación de fondo. También, han habido exposiciones a radiación ionizante por accidentes. Por otro lado, los seres humanos podemos estar expuestos a la radiación ionizante de dosis bajas en diagnósticos médicos y estos procedimientos pueden repetirse con frecuencia en la misma persona (Squillaro et al., 2018).

Cuando la radiación ionizante interactúa con el tejido biológico causa daño directamente e incluso la muerte; el nivel del daño depende del tipo del tejido expuesto, la naturaleza de la radiación y la dosis. Este tipo de radiación es un potente agente mutagénico capaz de inducir mutaciones y aberraciones cromosómicas en el organismo. A dosis no letales puede ser capaz de inducir inestabilidad genómica favoreciendo la carcinogénesis (Agarwal et al., 2015, Kuefner et al., 2015), también induce muerte celular a través de diferentes mecanismos como lo son: apoptosis, necrosis, necroptosis, autofagia, senescencia y catástrofe mitótica. Ha sido reportado que, la irradiación induce apoptosis en la mayoría de las células normales, así la susceptibilidad de este mecanismo es una determinante principal de radiosensibilidad para la mayoría de las células; esto ha sido señalado por Mischczyk y colaboradores (2018) (Mischczyk et al., 2018) quienes estudiaron la respuesta respecto a la muerte celular en leucocitos humanos expuestos a radiación de protones y rayos X, observando que estos se mueren por diferente proceso según el tipo de radiación, predominando la apoptosis al irradiar con rayos X y la necrosis con protones.

Los rayos X desde que fueron descubiertos por Röntgen, se han usado para observar estructuras óseas, surgiendo la especialidad médica de

la radiología que emplea la radiografía como ayuda en el diagnóstico. Las imágenes médicas desde la década de 1980, han sido relevantes en el área de diagnóstico para la atención médica, exponiendo a los pacientes a la radiación ionizante a frecuencias cada vez mayores (Truong et al., 2018). Los profesionales que trabajan en contacto con la radiación siempre están expuestos al daño potencial, para observar la respuesta celular con el grado de exposición se han tomado como referencia, las células hematopoyéticas debido a que se consideran muy radiosensibles, especialmente los linfocitos que muestran la mayor respuesta a las dosis bajas de radiación. Diversos estudios (DavudianTalab et al., 2018, Faraj and Mohammed, 2018, Feinendegen and Cuttler, 2018) han enfatizado la importancia del análisis de las células sanguíneas para la evaluación de los efectos de la radiación en el cuerpo, especialmente entre los radiólogos, que pueden desempeñar un papel importante en el pronóstico y el diagnóstico de complicaciones.

El efecto biológico relevante de los rayos X es secundario a la ionización. La ionización de las moléculas de agua puede crear radicales hidroxilo que pueden interactuar con el ADN causando rompimiento de las cadenas o daños en las bases; El ADN también puede ser ionizado directamente. Aunque la mayoría del daño inducido por la radiación se repara rápidamente, la reparación incorrecta puede llevar a mutaciones puntuales, translocaciones de cromosomas y fusiones de genes que están vinculadas a la inducción de cáncer. Se suele pensar que este efecto es estocástico, es decir, puede ocurrir en cualquier nivel de exposición a la radiación, y la probabilidad aumenta a medida que aumenta la dosis (Lin, 2010).

El cuerpo humano está conformado por aproximadamente  $3.72 \times 10^{13}$  de células eucariotas (Bianconi et al., 2013), cada una de estas posee una función específica con la que mantienen la homeostasis perfecta de cada sistema en el organismo. Dentro de los distintos tipos celulares se encuentran los leucocitos que son indispensables para la respuesta inmunitaria, asumiendo un rol relevante en el proceso de salud-enfermedad de cada individuo, por lo cual es de gran interés estudiarlos. Los leucocitos como todas las demás células son sensibles a los

cambios de su medio extracelular, activando mecanismos de reparación o de apoptosis cuando son dañados por innumerables factores estresantes. Uno de estos factores es la radiación, que es un fenómeno en el cual se propaga energía en forma de ondas electromagnéticas o de partícula a través de la materia (Lumniczky et al., 2018).

Los leucocitos son células muy radiosensibles, especialmente a los rayos X (Bregues et al., 2017). Es común que se presente linfopenia como uno de los primeros síntomas a la exposición de radiación, además se presentan alteraciones en su metabolismo debido a cambios en la conformación de la membrana, su permeabilidad y actividad enzimática (Feinendegen and Cuttler, 2018), por ende, la función de la célula cambia como resultado de los daños post-radiación. La facilidad de obtención, la gran cantidad de células que podemos obtener y su alta radiosensibilidad, hace de los leucocitos un modelo experimental idóneo para estudiar.

Existen diversas proteínas que participan en la regulación de la apoptosis, y que sirven como bioindicadores de que la célula está siendo estresada particularmente por la radiación ionizante. Algunas de estas son la proteína de estrés calórico Hsp70 que normalmente ayuda al plegamiento de las proteínas recién sintetizadas pero recientemente se ha observado que también poseen un rol de inmunomodulación en respuesta a la radiación (Multhoff et al., 2015); p53 una proteína supresora de tumores esencial para inducir la respuesta celular ante el daño al ADN deteniendo el ciclo celular (Joerger and Fersht, 2016); la caspasa-8 y la caspasa-3 que ambas son necesarias en la regulación de apoptosis celular además de que se ha observado un aumento en la expresión de estas en células expuestas a radiación ionizante (Michelin et al., 2004).

Un estudio reciente con 952,420 entre 18 y 64 adultos en los EE. UU. mostró que un número considerable de pacientes recibió hasta 0.05 Gy / año, un valor considerable, dados los niveles de referencia para emergencias proporcionados



por la Comisión Internacional de Protección Radiológica (ICRP) ) que se encuentra entre 20.02 a 0.05 Gy / año (Fazel et al., 2009). Debido a que la exposición a la radiación es tan ubicua y puede variar mucho entre las poblaciones, es importante comprender completamente los efectos de las dosis altas y bajas de radiación en todos los tipos de tejidos y células humanos para reconocer y prevenir los efectos perjudiciales (Truong et al., 2018).

Es de gran interés estudiar los efectos de la radiación sobre las células del cuerpo humano en especial los leucocitos los cuales son los principalmente afectados cuando los seres humanos nos exponemos a la radiación ionizante, principalmente con mayor riesgo al personal ocupacionalmente expuesto ya que se ha observado una disminución en los parámetros hematológicos en estudios clínicos (DavudianTalab et al., 2018, Faraj and Mohammed, 2018). Se ha investigado la relación de la expresión de algunas proteínas con la apoptosis en células irradiadas, por ejemplo estudios con Hsp70, donde tiene un rol en la recuperación de la célula al estar estresada (Multhoff et al., 2015, Murakami et al., 2015), p53 un punto de control en la cascada de apoptosis en exposiciones con radiación ionizante, además de ser un fundamental como supresor de tumores (Fei and El-Deiry, 2003), y las caspasas proteasas mediadoras de la apoptosis, particularmente para nuestro trabajo inducida por la radiación (Rahmanian et al., 2016). Por esta razón, es importante evaluar los cambios en la expresión de las proteínas Hsp70, p53, caspasa-8, caspasa-3 y/o muerte celular por apoptosis en leucocitos humanos expuestos a rayos X provenientes de equipos odontológicos.

## **Pregunta de Investigación**

¿Es la expresión de las proteínas Hsp70, p53, caspasa-8 y caspasa-3 modificada por muerte celular debido a la apoptosis en leucocitos humanos expuestos a dosis ( $2.28 \pm 0.05$ ,  $4.56 \pm 0.09$  mGy,  $9.12 \pm 0.18$  y  $13.69 \pm 0.27$  mGy) de rayos X provenientes de equipos odontológicos?

## **Hipótesis**

La expresión de las proteínas Hsp70, p53, caspasa-8 y caspasa-3 en leucocitos humanos se modifica por muerte celular debido a la apoptosis por la exposición de rayos X provenientes de equipos odontológicos.

## **Objetivo general**

Evaluar los cambios en la expresión de las proteínas Hsp70, p53, caspasa-8 y caspasa-3 y/o muerte celular por apoptosis en leucocitos humanos expuestos a rayos X provenientes de equipos odontológicos.

## **Objetivos específicos**

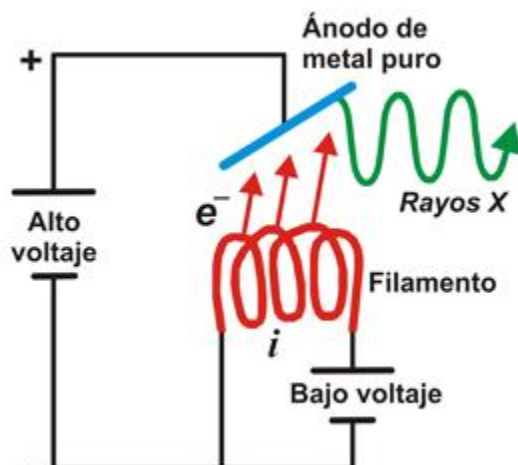
1. Exponer los leucocitos humanos a las siguientes dosis ( $2.28 \pm 0.05$ ,  $4.56 \pm 0.09$  mGy,  $9.12 \pm 0.18$  y  $13.69 \pm 0.27$  mGy) de rayos X.
2. Evaluar la viabilidad celular para los distintos tratamientos de exposición.
3. Determinar la expresión de Hsp70, p53, caspasa-8 y caspasa-3.
4. Establecer la relación entre los cambios morfológicos y/o muerte celular por apoptosis como respuesta de exposición a radiación ionizante (rayos X).

## II REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Rayos X

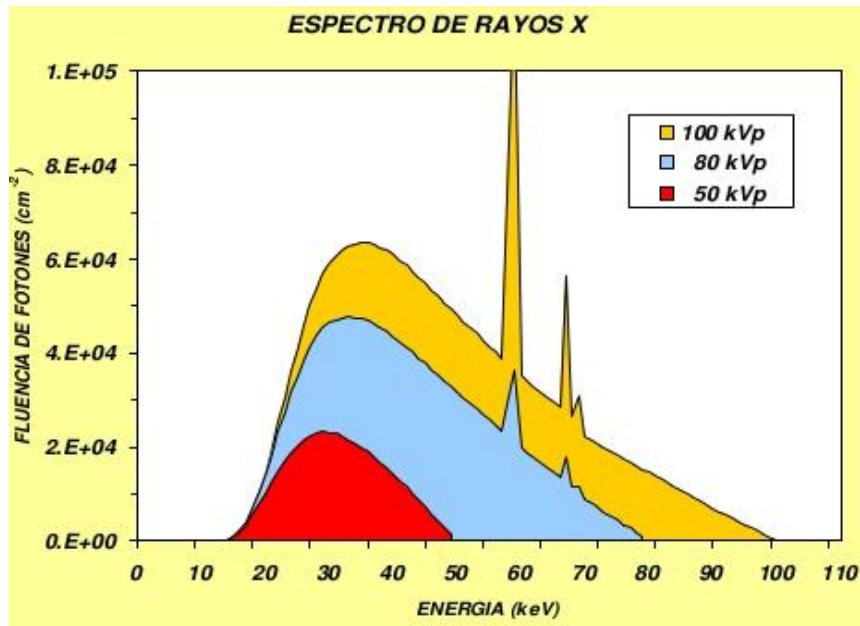
Los rayos X son fotones que poseen una longitud de onda de 10 a 0.01 nanómetros, correspondiendo a frecuencias en el rango de 30 a 30000 PHz (El número de ciclos por segundo de una onda electromagnética es la frecuencia, generalmente expresada en segundos inversos ( $\text{seg}^{-1}$ ) o Hertz (Hz)), son invisibles para el ojo humano, y forman parte de la radiación ionizante (Als-Nielsen, 2011). Se diferencian de los rayos gamma por su origen, debido a que los rayos X surgen de fenómenos extranucleares, en las orbitas electrónicas, mientras que los rayos gamma se originan en el núcleo atómico. Son considerados como radiación ionizante porque al interactuar con la materia producen ionización de los átomos de generan partículas cargadas eléctricamente que se denominan iones. Los rayos X tienen diversas aplicaciones, una de las principales es en la medicina, donde se utilizan para el diagnóstico de enfermedades del sistema óseo, de tejidos blandos y de vasos sanguíneos (Badel et al., 2018).

Se pueden producir rayos X por diferentes mecanismos como son el decaimiento beta de átomos radiactivos, el fenómeno de conversión interna, el de captura electrónica y por la desaceleración de electrones. Este último se utiliza en las máquinas de rayos X de laboratorios, hospitales y consultorios odontológicos (DavudianTalab et al., 2018). Este mecanismo (**Figura 1**) consiste en un tubo de rayos X conformado por dos electrodos (cátodo y ánodo), una fuente de electrones (cátodo caliente) y un blanco (**Figura 2**). Los electrones se aceleran mediante una diferencia de potencial entre el cátodo y el ánodo. La radiación es producida justo en la zona de impacto de los electrones y se emite en todas direcciones. La energía adquirida por los electrones va a estar determinada por el voltaje aplicado entre los dos electrodos. Los diferentes electrones no chocan con el blanco de igual manera, así que este puede ceder su energía en una o en varias colisiones, produciendo un espectro continuo (Seibert, 2004).



**Figura 1.** Esquema de la producción de rayos X en un tubo convencional.

Para activar el tubo de rayos X, es necesaria una fuente de alimentación de alto voltaje, ésta determina la penetración de los rayos X. Los parámetros básicos que miden la producción de rayos X son los kV, los mA y el tiempo de exposición en milisegundos. Los miliamperios determinan la intensidad de rayos X, es decir la cantidad de rayos creados y el tiempo de exposición marca la duración de este proceso por cada disparo. El haz de electrones constituye una corriente eléctrica entre los dos electrodos, medida en miliamperios (Carlos et al., 2008). La cantidad de rayos y su energía se relacionan con la dosis de radiación que es proporcional a la corriente de electrones, ésta se controla mediante una fuente de alimentación del filamento. La energía máxima de los rayos X está dada por el voltaje aplicado, la mínima por el espesor del vidrio que tienen que atravesar al salir del tubo (Behling, 2016).



**Figura 2.** Espectro de los rayos X respecto al voltaje del tubo.

### 2.1.1. Magnitudes y unidades dosimétricas

En dosimetría se usan unidades y magnitudes específicas a nivel internacional, establecidas para proporcionar una medida física que se correlacione con los efectos reales o potenciales de la radiación, son en esencia un producto de magnitudes radiométricas y coeficientes de interacción (Ubeda et al., 2015). La primera es la exposición que es la carga que se ha producido en una masa de aire por fotones, sus unidades en el SI son C/kg de aire. Para el contexto biológico se utiliza la dosis absorbida (D) que mide la energía depositada en un medio por unidad de masa; la unidad en el SI para esta magnitud es el J/kg, que recibe el nombre especial de Gray (Ubeda de la C et al., 2018). Debe tenerse en cuenta que esta magnitud no es un buen indicador de los efectos biológicos de la radiación sobre los seres vivos; para esto se debe incluir el tipo de radiación, y las características del material biológico. Por otro lado, se encuentra la dosis equivalente (H) que es una magnitud física que describe el efecto relativo de los distintos tipos de radiaciones ionizantes sobre los tejidos vivos, su unidad de

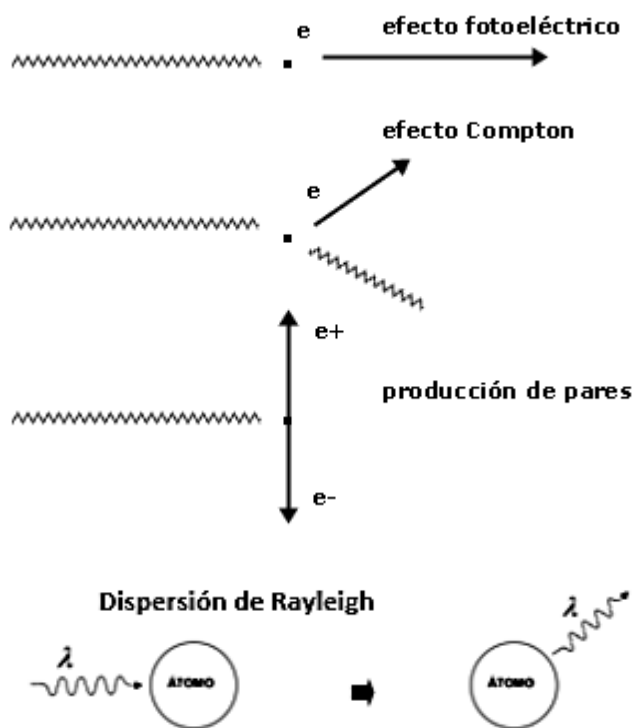
medida es el sievert; esta magnitud tiene mayor significado biológico que la dosis absorbida. La dosis equivalente se calcula multiplicando la dosis absorbida por un factor de calidad (Durham, 2006).

El límite de exposición se fija en 100 mSv cada 5 años para el personal ocupacionalmente expuesto, sin superar los 50 mSv por año. Para el público en general, se fijan límites de exposición más bajos y se recomienda evitar dosis equivalentes superiores a los 5 mSv (0.5 rem)/año en exposiciones a fuentes de radiación artificiales (ICRP, 1991).

### **2.1.2. Efectos de los rayos X sobre los organismos biológicos**

La radiación ionizante es capaz de atravesar el cuerpo humano, de interaccionar con el material biológico y por ende causar daño al organismo. El grado de daño depende de diversos factores como el tipo de radiación, la cantidad de dosis, la tasa de dosis, la edad, etc. La radiación puede afectar el funcionamiento de órganos, produciendo efectos agudos tales como lesiones en la piel, caída del cabello, quemaduras, en casos más graves síndrome de irradiación (UNSCEAR, 1982).

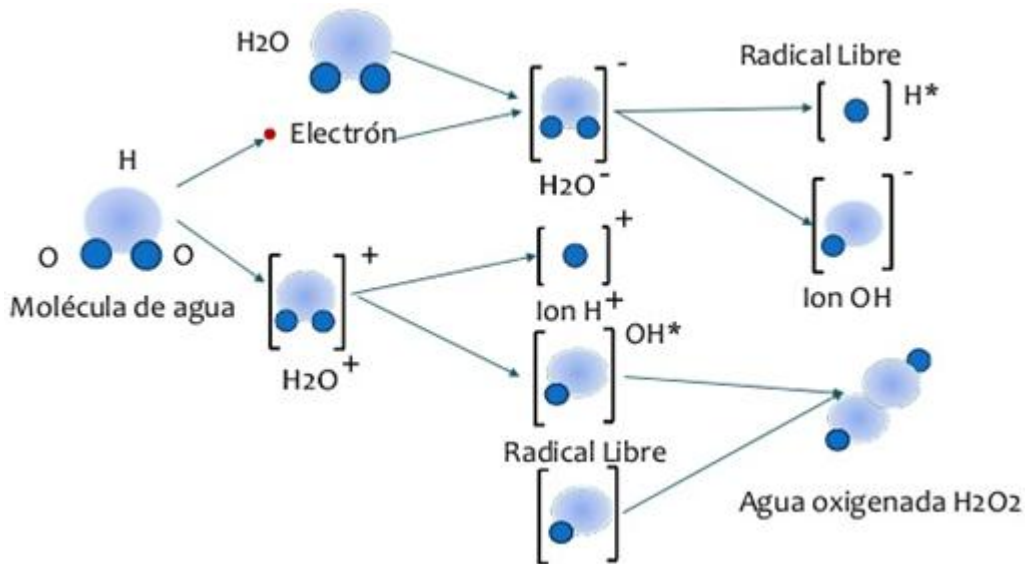
Los rayos X interactúan con la materia a través de cuatro procesos principales que son la dispersión Rayleigh, el efecto fotoeléctrico, la dispersión Compton y la producción de pares (Cember, 2008) (**Figura 3**). Dependiendo de la dosis, los efectos de la radiación ionizante sobre las células humanas se dividen en efectos estocásticos y deterministas. Los primeros se presentan con exposición a dosis bajas de radiación durante un período de tiempo prolongado, y la probabilidad de que ocurran estos efectos es directamente proporcional a la dosis por lo que estos no presentan umbral; esto significa que hay una probabilidad de que el efecto ocurra a una dosis muy baja. Por otro lado los efectos deterministas aumentan al presentarse dosis especialmente altas en un corto periodo de tiempo, estos se caracterizan por tener un umbral (Hendry, 2012).



**Figura 3.** Interacción de los rayos X con la materia.

Cuando los rayos X inciden sobre un organismo vivo, la interacción a nivel celular se puede llevar a cabo en la membrana, el citoplasma, los organelos o el núcleo. Si esta interacción sucede en alguna de las membranas se producen alteraciones de permeabilidad, por lo que afecta al intercambio de fluidos en mayor cantidad de lo normal (DavudianTalab et al., 2018). En el caso, cuando la interacción sucede en el citoplasma, cuya principal sustancia es el agua, ésta es ionizada formando radicales químicamente inestables (**Figura 4**). Algunos de estos radicales tenderán a unirse para formar moléculas de agua y moléculas de hidrógeno (H), otros en cambio se combinan para formar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual produce alteraciones en el funcionamiento de las células y algunos más formando el ion hidroxilo ( $HO^-$ ), el cual produce envenenamiento celular (Feinendegen and Cuttler, 2018). Cuando la radiación ionizante llega hasta el núcleo de la célula, puede causar alteraciones de los genes e inclusive

rompimiento de los cromosomas, provocando que cuando la célula se divida lo haga con características diferentes a la célula original (Lomax et al., 2013). Todas estas alteraciones pueden llegar a causar en las células, su aumento o disminución de volumen, mutaciones genéticas, un estado latente y muerte, produciendo patologías especiales como el cáncer. El riesgo presentar cáncer inducido por radiación varía en función de sexo, edad de exposición, dosis de radiación, tasa de dosis, la calidad de radiación, una serie de factores genéticos y epigenéticos además del estilo de vida de cada individuo expuesto (Morgan and Sowa, 2015).



**Figura 4.** Radiólisis del agua.

Existen pruebas, de que la exposición a dosis bajas de radiación ionizante induce una respuesta de estrés en las células (Vega-Carrillo et al., 2002, Candy Yuen Ping et al., 2017, Feinendegen and Cuttler, 2018, Mitchel, 2015, Møller and Mousseau, 2016, Tang and Loke, 2015, Rithidech and Scott, 2008). Cuando el estrés se manifiesta mediante la sobreexpresión de la proteína de choque térmico (Hsp70) existe una correlación entre la cantidad de proteína, y la dosis absorbida, por tal motivo ha sido señalado su uso como biodosímetro (Manzanares y Vega-Carrillo, 2005). Ésta a su vez induce la elevación de los mecanismos de



protección, que reducen el riesgo de presentar enfermedades espontáneas, así como enfermedades inducidas por la radiación. Esta respuesta protectora, se ha observado en todos los tipos de organismos examinados, desde unicelulares hasta humanos, lo que indica una conservación evolutiva estricta. En los mamíferos, los efectos protectores inducidos típicamente ocurren en dosis inferiores al orden de 100 mGy (Mitchel, 2015). Sin embargo, existen también datos radiobiológicos sobre los efectos dañinos de dosis bajas en las células, donde se ha observado que el ADN puede presentar daños irreversibles que desencadenan la apoptosis o la senescencia (Squillaro et al., 2018, Feinendegen and Cuttler, 2018, Lian et al., 2015, Lomax et al., 2013, Rühm et al., 2018, El-Shanshoury et al., 2016). Aún no se logra comprender el verdadero riesgo que implica la radiación ionizante a dosis bajas y quedan investigaciones pendientes para asegurar la protección radiológica de los seres humanos.

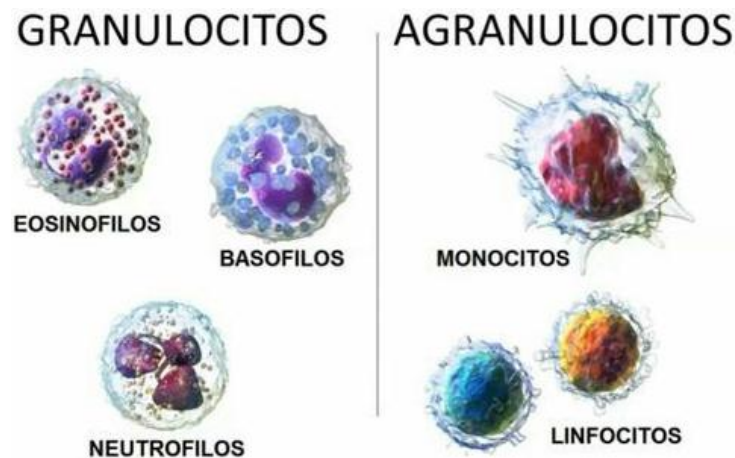
## **2.2. Leucocitos**

El sistema inmunológico es fundamental para mantener la vida de los seres humanos y la homeostasis del organismo, esto lo hace mediante dos procesos fundamentales la inmunidad innata y la adaptativa. Estos mecanismos funcionan gracias a células llamadas leucocitos o glóbulos blancos que trabajan especializadamente en el cuerpo humano (**Tabla 1**). Los leucocitos utilizan dos mecanismos para realizar su función de defensa, el mecanismo de la fagocitosis y el mecanismo de la inmunidad (humoral y el celular), pero además presentan otras funciones que los hace especiales como la quimiotaxis (atracción hacia sustancias químicas), diapédesis, y movimientos ameboides.

**Tabla 1.** Leucocitos y sus características.

Leucocito	Células/ mm <sup>3</sup>	Diámetro (μm)	Vida media
Neutrófilos	1800-7700	10 a 12	6 horas a unos cuantos días.
Linfocitos	1000-4800	7 a 15	Años, para células de memoria; y semanas para el resto.
Monocitos	0-800	12 a 15	De horas a días
Eosinófilos	0-450	10 a 12	8 a 12 días
Basófilos	0-200	12 a 15	De pocas horas hasta pocos días.

Los leucocitos se clasifican respecto a su función y a su morfología en cinco categorías: linfocitos, basófilos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos (**Figura 5**). Estos difieren en su textura y tamaño de núcleo, afinidad por diferentes colores fisiológicos y funciones en el sistema inmune (Rödel et al., 2013).



**Figura 5.** Tipos de leucocitos

Los neutrófilos defienden al organismo contra infecciones bacterianas o por hongos, usualmente son los primeros en responder a una infección microbiana. Los eosinófilos, ante todo, lidian con las infecciones parasitarias aunque también son las células inflamatorias predominantes durante una reacción alérgica. Los basófilos son principalmente responsables de las respuestas alérgicas ya que

liberan histamina, provocando vasodilatación. Los linfocitos tienen como función la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa (o específica), se diferencian en tres líneas de células reactivas: los linfocitos T que participan en la respuesta inmunitaria celular; los linfocitos B, que migran a diferentes tejidos linfáticos, son los encargados de la respuesta inmunitaria humoral, transformándose en plasmocitos que producen anticuerpos y las células NK (natural killer) que destruyen células infectadas (Rawat et al., 2015). Todos estos tipos celulares están circulando por las estructuras del cuerpo humano para mantenerlo en condiciones óptimas de salud.

Los leucocitos actúan contra sustancias extrañas o agentes infecciosos (antígenos), a través del torrente sanguíneo se mueven y distribuyen en todo el cuerpo. La función de los linfocitos y sus productos abarca desde la neutralización de patógenos con anticuerpos específicos hasta la activación de macrófagos, además de la actividad citotóxica directa. Los linfocitos B y T son responsables de las respuestas inmunitarias adaptativas, las células NK muestran un conjunto diferente de receptores de los expresados por los linfocitos B y T y son responsables de las respuestas innatas, contra las células infectadas por virus y tumorales (Olsen Saraiva Camara et al., 2012). Como respuesta a la exposición de la radiación se ha encontrado evidencia convincente de que los linfocitos son una característica recurrente en los tejidos normales dañados, así como también su alta radiosensibilidad a pesar de ser células muy especializadas (Schaue and McBride, 2012).

Los leucocitos han sido frecuentemente usados a nivel experimental para el estudio de diversas enfermedades, debido a sus múltiples funciones alrededor del organismo y en exposición a la radiación los linfocitos son muy sensibles, por ende se considera a este fenómeno un agente supresor inmunitario (Lumniczky et al., 2018). Los distintos tipos de leucocitos, en especial los linfocitos tienen radiosensibilidad (Susceptibilidad de una célula a la radiación ionizante) diferente. De hecho, las tasas de apoptosis espontánea e inducida por radiación son diferentes en las tres subpoblaciones de linfocitos (linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y

linfocitos B) de individuos sanos, siendo los T CD4<sup>+</sup> los más resistentes y los linfocitos B los más sensibles a la radiación (Bregues et al., 2017).

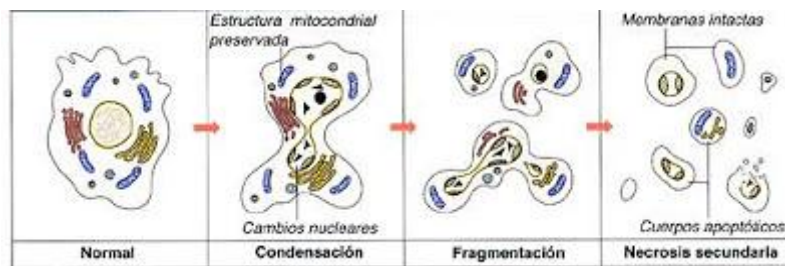
### **2.3. Apoptosis**

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso ordenado que se lleva a cabo con el fin de controlar el desarrollo y crecimiento de las células, ésta puede ser de naturaleza fisiológica, está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente o inducida por factores dañinos para la célula (Nagata, 2018). Su función más importante en los organismos, es la destrucción de células dañadas, evitando la aparición de enfermedades como el cáncer.

La apoptosis ocurre normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento, como un mecanismo homeostático para mantener las poblaciones de células en los tejidos (Galluzzi et al., 2018). Ésta puede producirse también como un mecanismo de defensa, en las reacciones inmunes o cuando las células son dañadas por enfermedades o agentes nocivos (Pyrshhev et al., 2018). Aunque hay una gran variedad de estímulos y condiciones, tanto fisiológicas como patológicas, que pueden desencadenar la apoptosis, no todas las células morirán necesariamente en respuesta al mismo estímulo. La irradiación o los fármacos utilizados para la quimioterapia contra el cáncer dan como resultado daño en el ADN de algunas células, lo que puede llevar a la muerte por apoptosis a través de una vía dependiente de p53. Algunas hormonas, como los corticosteroides, pueden conducir a la muerte apoptótica en algunas células (Galluzzi et al., 2018).

Algunas células expresan receptores de Fas o TNF que pueden conducir a la apoptosis a través de la unión del ligando y la reticulación de proteínas. Otras células tienen una ruta de muerte predeterminada que debe ser bloqueada por un factor de supervivencia como una hormona o un factor de crecimiento. También existe el problema de distinguir la apoptosis de la necrosis, dos procesos que pueden ocurrir de manera independiente, secuencial y simultánea (Kessel, 2019).

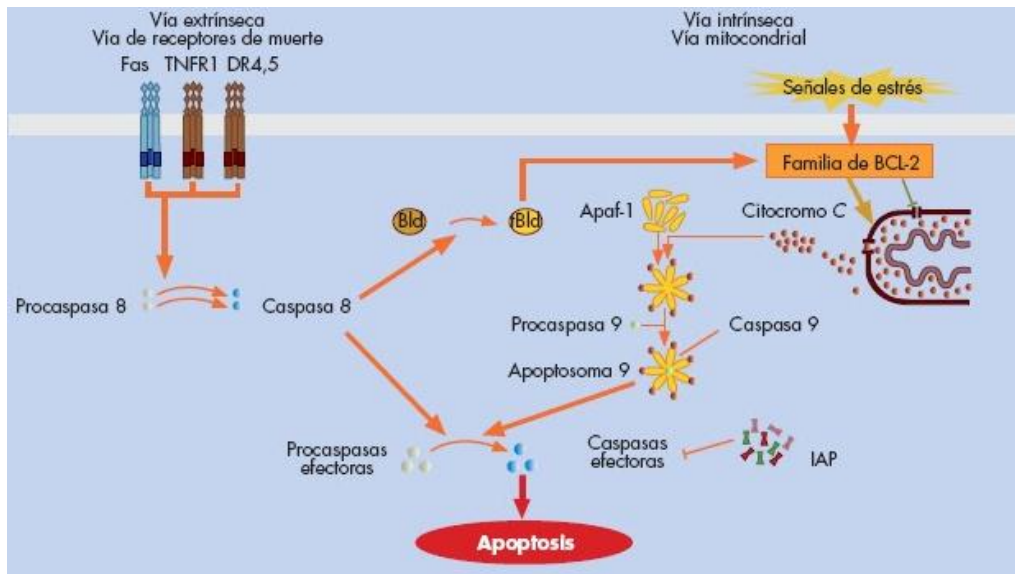
Las células sometidas a apoptosis se encogen, su membrana plasmática está aparentemente intacta, pero se somete a formación de ampollas, ocurre la fragmentación del ADN cromosómico en unidades nucleosómicas, se expone la fosfatidilserina en la superficie celular y se pierde el potencial mitocondrial. Se pueden observar características morfológicas celulares esenciales (**Figura 6**) como, contracción celular, picnosis (resultado de la condensación de la cromatina) característica más importante en la apoptosis, contracción celular, las células son más pequeñas, citoplasma denso y los orgánulos están más apretados, cariorrexis (ruptura del núcleo celular) y separación de fragmentos celulares (citoplasma con organelos apretados con o sin un fragmento nuclear) en cuerpos apoptóticos (Pyrshv et al., 2018). Una vez que se forman los cuerpos apoptóticos, estos son fagocitados por macrófagos, células parenquimatosas o células neoplásicas y degradados dentro de los fagolisosomas (Elmore, 2007).



**Figura 6.** Fases de la apoptosis.

Mecanismos altamente complejos y sofisticados producen la apoptosis, esta comprende una cascada de eventos moleculares dependientes de la energía. Hay dos vías apoptóticas principales: la vía del receptor extrínseco o de la muerte y la vía intrínseca o mitocondrial (**Figura 7**). Existe evidencia de que las dos vías están relacionadas y que las moléculas de una vía pueden influir en la otra (Igney and Krammer, 2002). Hay una ruta adicional que implica citotoxicidad mediada por células T y muerte de la célula dependiente de perforina-granzima, esta vía puede inducir apoptosis a través de granzima B o granzima A (Elmore, 2007). La

apoptosis se considera uno de los principales mecanismos de muerte celular por la exposición a la radiación (Eriksson and Stigbrand, 2010).



**Figura 7.** Vías de la apoptosis.

Normalmente, la apoptosis en los linfocitos es un proceso para eliminar a estos cuando son autorreactivos o para contener la activación de las células inmunitarias, pero este proceso puede ser activado por algunos estresores externos y conducir a la muerte celular por esta vía (Wesche et al., 2005).

## 2.4. Proteínas celulares

En la célula, están presentes moléculas conformadas por un grupo amino y uno carboxilo llamadas proteínas, estas se localizan dentro de los espacios celulares o se incrustan en las membranas, donde desempeñan diversas funciones (catálisis, reguladoras, estructurales, defensivas, receptoras y de transporte) para regular la supervivencia celular, la proliferación, la diferenciación o la muerte (Bauer et al., 2015).

Las proteínas se sintetizan por medio de un proceso complejo a partir de los genes almacenados en el núcleo celular, por medio de la traducción de proteínas que se produce principalmente en el citosol, de ahí se mueven precisamente a sus destinos finales donde son esenciales estas para mantener la función y las actividades celulares adecuadas (Hung and Link, 2011). Se estima que aproximadamente la mitad de las proteínas deben ser transportadas a su destino para poder ser funcionales (Kirsch et al., 2017).

A partir de un molde de ARNm se producen las proteínas, a este proceso se le denomina traducción. El ARNm se carga y se lee en el ribosoma de tres en tres nucleótidos, emparejando cada codón con su anticodón complementario localizado en una molécula de ARN de transferencia biosintetizándose siempre del extremo N-terminal al extremo C-terminal. Después ésta debe plegarse de la forma adecuada para llegar a su estructura nativa, la que desempeña la función. El tamaño de la proteína sintetizada puede medirse por el número de aminoácidos que contiene y por su masa molecular total, que normalmente se expresa en daltons (Da) (sinónimo de unidad de masa atómica), o su unidad derivada kilodalton (kDa) (Alberts, 2013).

## **2.5. Biomarcadores en la radiación ionizante**

Los biomarcadores son atributos de los sistemas biológicos que se emplean para descifrar factores de su ambiente, se deben poder medir y ser evaluados objetivamente como un indicador de un proceso biológico normal, estado patogénico o de respuesta. Los biomarcadores celulares son medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes. Este indicador señala la exposición del organismo a sustancias tóxicas o a estrés y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante.

Se puede considerar un biomarcador a cualquier alteración molecular específica de la célula a nivel de ADN, ARN, metabolito o proteína. Un biomarcador puede ser tan simple como una prueba de laboratorio o tan complejo como un patrón de genes o proteínas. Desde un punto de vista práctico, el biomarcador reflejaría específica y sensiblemente un estado de enfermedad, podría utilizarse para el diagnóstico, así como para el control de la enfermedad durante y después del tratamiento. El término "biomarcador negativo" se usa para un marcador que es deficiente o está ausente en una enfermedad. En la era de la biología molecular, los biomarcadores se pueden dividir en tres categorías amplias: Aquellos que hacen un seguimiento de la progresión de la enfermedad con el tiempo y se correlacionan con medidas clínicas conocidas. Los que detectan el efecto de un fármaco y los que sirven como puntos finales sustitutos en los ensayos clínicos (Kewal K., 2010).

Hoy en día aún hay importantes preguntas sin respuesta que deben abordarse para aumentar la comprensión del impacto de la baja dosis, en la exposición a la radiación, a lo largo de los años las investigaciones han tratado de encontrar biomarcadores específicos de la radiación pero todavía falta mucho por estudiar (Tichy et al., 2018). Esta búsqueda ha sido una tarea ardua, y principalmente se han tratado de encontrar biomarcadores de dosis efectivas además de los efectos tempranos de la exposición a la radiación ionizante. Las células sanguíneas y el suero han demostrado ser fuentes abundantes de biomarcadores de radiación humana, incluidos los daños y reparaciones del ADN, las aberraciones cromosómicas, los enlaces cruzados de la proteína del ADN, los niveles de poliamina en los glóbulos rojos, los perfiles proteómicos séricos y los perfiles de expresión génica determinados por ambos microarrays y RT-PCR (Tyburski et al., 2008).

Un biomarcador ideal, debería ser específico de la radiación e independiente de otras exposiciones ambientales, como el tabaco u otros tratamientos, con esto se simplificaría el análisis y ayudaría a fundamentar la causalidad de la radiación. Sin embargo, los biomarcadores a menudo carecen de especificidad y pueden reflejar



la exposición a otros agentes ambientales o enfermedades. Esto no les resta importancia, todavía pueden ser informativos para predecir el desarrollo de la enfermedad inducida por radiación si tales exposiciones son, por ejemplo, aditivas o interactivas (Hall et al., 2017).

### **2.5.1. Proteínas de choque térmico**

En 1962 Ritossa estudió las larvas de *Drosophila melanogaster* sometiéndolas a altas temperaturas, y descubrió que se inducen un conjunto específico de genes. Posteriormente, los productos de estos genes se identificaron como "proteínas de choque térmico" (Hsp). Estas proteínas poseen funciones esenciales en el metabolismo de proteínas, en los procesos de transporte a través de membranas, así como a su integración a diversos organelos, actúan como chaperonas que se unen y estabilizan a una parte inestable de otra proteína, mediante la unión controlada y la liberación, facilitan su destino correcto (plegamiento, ensamblaje oligomérico, transporte a un compartimento subcelular particular, o eliminación por degradación) (Sarkar and Roy, 2017). Estas pueden ser inducidas por una amplia gama de estresores como temperatura, hipoxia, radiación, inflamación, infecciones o contaminantes ambientales (Wang and Li, 2014). En la Universidad Autónoma de Zacatecas se ha reportado la cantidad de proteína Hsp70 sobre expresada en linfocitos humanos expuestos a rayos gamma de baja intensidad (Vega Carrillo, et al., 1999; Sánchez Rodríguez et al., 1999; Vega Carrillo, et al., 2000)

Las proteínas Hsp pueden regular la vida o muerte de las células directamente, modulando ciertos eventos de señalización apoptótica o indirectamente, al participar en procesamiento de antígenos, se localizan principalmente en el citosol (Horváth et al., 2008). Estas proteínas además tienen un papel en la protección de las células contra el daño letal inducido por el estrés exógeno y endógeno mediante el apoyo de la degradación de proteínas, el plegamiento, el transporte de polipéptidos recién producidos y las proteínas aberrantes plegadas .

Las Hsps se sobre expresan en un amplio espectro de tumores malignos humanos que contribuyen al crecimiento, la diferenciación, la invasividad y la metástasis del tumor, y se asocian a un mal pronóstico. Se ha demostrado también, que la sobreexpresión de Hsp en células tumorales juega un papel fundamental en la tumorigénesis al inhibir la apoptosis y la senescencia (Rödel et al., 2013). Por consiguiente podemos demostrar que es importante el estudio de estas proteínas cuando las células están expuestas a la radiación ionizante.

#### **2.5.1.1. Hsp70**

Las proteínas de estrés calórico son macromoléculas que están compuestas por la unión de cientos de aminoácidos en cadenas que se pliegan para adquirir una conformación tridimensional (Shevtsov et al., 2018). Esta conformación terciaria es la que permite a la proteína realizar su función, con base a esto y a su peso molecular se han agrupado en familias para su estudio (Murakami et al., 2015).

La familia de las Hsp70 representa una de las familias más grandes dentro de las proteínas de choque térmico. La mayoría de la familia de las proteínas Hsp70 residen en el citosol, donde mantienen la homeostasis proteica apoyando el plegamiento, replegamiento y ensamblaje de polipéptidos nacientes, previniendo la agregación de proteínas y ayudando al transporte de otras proteínas a través de las membranas (Rödel et al., 2013).

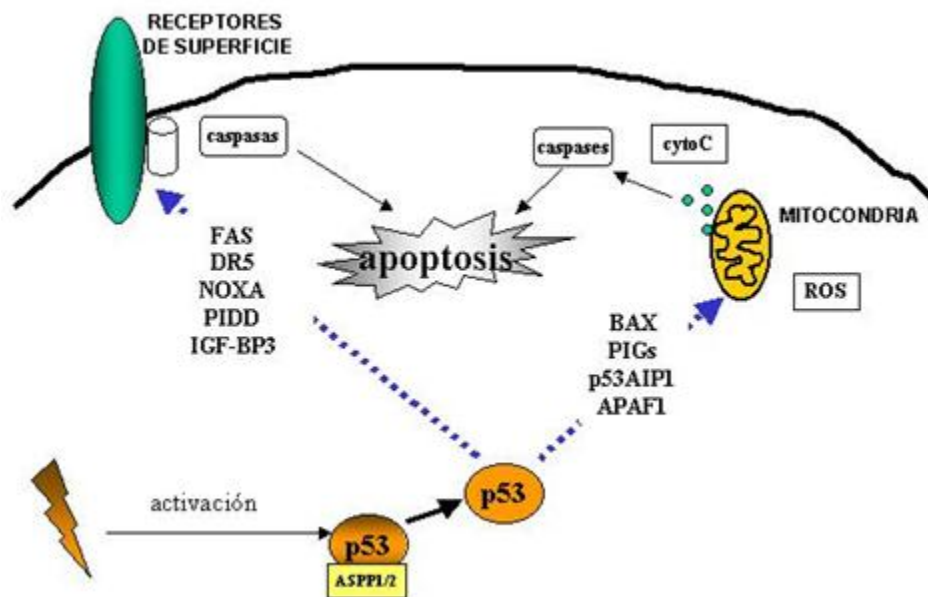
Las proteínas de estrés o de choque térmico como Hsp70, se expresan en respuesta a una amplia variedad de agresiones fisiológicas y ambientales, como el calor, las especies reactivas de oxígeno, sustancias químicas y radiación tanto no ionizante como ionizante (Ohtsuka and Hata, 2000). Por medio de varios mecanismos es posible explicar la actividad citoprotectora de estas proteínas, por ejemplo la inhibición de efectores clave de la maquinaria apoptótica, incluidos el apoptosoma, el complejo de activación de la caspasa y el factor inductor de la

apoptosis, y la degradación mediada por proteasoma de las proteínas reguladoras de la apoptosis (Sabirzhanov et al., 2012).

### 2.5.2. p53

Hace 3 décadas, se identificó a la proteína p53 denominada como el "guardián del genoma", uno de los primeros genes supresores de tumores, un factor de transcripción específico de secuencia activado por diversas señales de estrés (Otto and Sicinski, 2017).

La activación de p53 regula a genes que participan en diversas funciones celulares, siendo el más importante el arresto del ciclo celular y la apoptosis (**Figura 8**). Regulando también los procesos de reparación del ADN, el paro del ciclo celular que se produce en las transiciones G1-S y G2-M. En consecuencia el grado de reparación del daño del ADN es muy importante para determinar la supervivencia o la muerte celular (O'Brate and Giannakakou, 2003). Tras la irradiación, la activación de p53 promueve la supervivencia celular mediante la detención del crecimiento y la reparación del daño del ADN (Eriksson and Stigbrand, 2010), la pérdida de esta función confiere resistencia a la radiación, por esta razón es asociada con fenotipos tumorales agresivos (Multhoff et al.) de ahí su importancia en los estudios clínicos de cáncer y de exposición a la radiación ionizante (Joerger and Fersht, 2016).



**Figura 8.** El papel de p53 en la apoptosis

### 2.5.3. Caspasa-8

Se conocen más de catorce caspasas, de algunas de ellas se desconoce su función y de otras como las caspasas 2, 3, 6, 7, 8, 9, y 10 se sabe que están implicadas en la regulación y en la ejecución de la apoptosis (Rahmanian et al., 2016). Todas las caspasas apoptóticas permanecen en las células normales como proenzimas inactivas, similares a los zimógenos de la coagulación de la sangre, pero cuando las células entran en apoptosis, las caspasas se activan a través de uno o dos pasos proteolíticos que acaban por cortar el péptido precursor, dando como resultado la generación de dos fragmentos (grande y pequeño) que constituyen la enzima activa (McArthur and Kile, 2018).

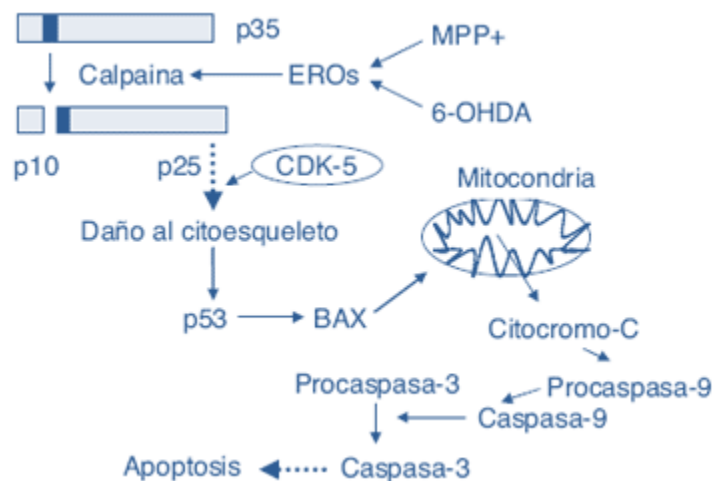
La caspasa-8 es una de las iniciadoras de la cascada de la apoptosis, primero se recluta y luego se procesa su procaspasa-8, generándose dos fragmentos catalíticos que forman la caspasa-8, esta conduce a la activación de otras caspasas para formar una cascada que culminara en la apoptosis (Tummers and Green, 2017).

### 2.5.4. Caspasa-3

Las caspasas (cisteína-aspártico proteasas, cisteína aspartasas o cisteína dependientes de aspartato-proteasas dirigidas) son una familia de enzimas con función de proteasas las cuales tienen un papel fundamental en el control de la homeostasis en procesos de apoptosis e inflamación. Estas enzimas se han categorizado en iniciadores (apical: CASP2, CASP8, CASP9 y CASP10) y efectores (verdugo: CASP3, CASP6 y CASP7). Se cree que las caspasas están presentes como enzimas precursoras monoméricas inactivas que deben ser dimerizadas para una activación completa (Rahmanian et al., 2016).

Las caspasas son proteínas esenciales durante la apoptosis, debido a que durante este proceso, casi 1,300 proteínas diferentes se rompen mediante caspasas en más de 1,700 sitios (Nagata, 2018). La apoptosis inducida por radiación puede activar la cascada de caspasas a través de la vía intrínseca y extrínseca (Eriksson and Stigbrand, 2010).

La caspasa-3 está al final de la cascada de caspasas (**Figura 9**) y se activa tanto por las vías de muerte intrínseca como extrínseca, es concebible que las características generales de la apoptosis estén mediadas por los sustratos de caspasa-3 (Nagata, 2018).



**Figura 9.** Cascada de caspasas en la apoptosis.

Se considera la más importante de las caspasas, se activa por cualquiera de las caspasas iniciadoras (caspasa-8, caspasa-9 o caspasa-10), induce la reorganización del citoesqueleto y la desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos. Por consiguiente, es de suma relevancia el estudio de la caspasa-3 debido a que es bien conocido que los defectos en la activación de la caspasa en cascada conducen a la progresión tumoral y a la metástasis mientras que su activación por compuestos que sensibilizan las células tumorales a la radiación ionizante las cuales dan como resultado la inducción de apoptosis, reducción del tamaño tumoral y control del desarrollo del cáncer. La amplificación en la expresión de la proteína caspasa-3 después de la exposición a la radiación induce la muerte celular a través de la vía apoptótica (Rahmanian et al., 2016).

La apoptosis se puede medir por varios métodos aprovechando los cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares que se producen en una célula durante este proceso. El sello bioquímico mejor reconocido de las etapas tempranas y tardías de la apoptosis es la activación de las proteasas de cisteína (caspasas). La detección de caspasa-3 activa en células y tejidos es un método importante para la apoptosis inducida por una amplia variedad de señales apoptóticas (Choudhary et al., 2015).

## III MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de determinar el efecto que producen rayos X de 70 kV en linfocitos humanos se expusieron estos a diferentes dosis.

### 3.1. Selección y número de muestras

Se seleccionaron 4 donadores de edades entre 20-24 años para mantener un margen de edad y la radiosensibilidad no sea diferente, sin historial de radioterapia, ni consumo de alcohol, tabaco, medicamentos, sin presentar síntomas y signos de enfermedad, de los cuales se obtuvieron muestras de sangre venosa periférica (venopunción antebraquial), aproximadamente 5 ml con 50  $\mu$ L de heparina.

### 3.2. Exposición de leucocitos

#### 3.2.1. Rayos X

La exposición de las muestras se realizó con una fuente de rayos X marca Corix® de la empresa CORAMEX, S.A. que opera a 70 kV y una corriente de 8 mA, con número de serie: A30852 (**Figura 10**), con tiempo de exposición de 0.15 s aproximadamente para cada disparo. Se realizaron 5, 10, 20 y 30 disparos respectivamente para cada muestra (**Figura 11**).



**Figura 10.** Equipo de rayos X odontológicos.



**Figura 11.** Protocolo de irradiación para cada una de las muestras.

### **3.2.1.1. Determinación de la dosis absorbida**

La dosis absorbida fue determinada usando TLD's (detectores termoluminiscentes), que se depositaron en viales de cono. Cada vial contenía un TLD-100 que se ubicó en la base de un irradiador de unicel. El cono del equipo de rayos X entra por la parte superior del irradiador; bajo este arreglo el blanco del tubo de rayos X y los viales se encontraron a la misma distancia.

Los TLD-100 fueron expuestos en grupos de cuatro, para cada diferente cantidad de disparos del equipo de rayos X. Un lote de TLDs 100 se utilizó para medir la radiación de fondo. El procedimiento se repitió con un monitor de estado sólido RaySafe modelo ThinX RAD que se activa cuando el equipo de rayos X se dispara. El mismo número de disparos usados para exponer los TLDs se usaron con el equipo RaySafe.



Antes de su uso, el lote de TLDs se calentó a 400 °C por 1 hora, con el fin de borrarlos, después de haber sido expuestos se leyeron en un lector HarshawTLD 3500 de Thermo Scientific en atmosfera de nitrógeno. La respuesta termoluminiscente de cada TLD se obtuvo desde 50 °C a 350 °C con un gradiente de temperatura de 10 °C/s.

Las respuestas de los TLDs expuestos se promediaron y se corrigió con la respuesta promedio de los TLDs usados para medir el fondo. Estos valores se correlacionaron con las lecturas del monitor RaySafe y se obtuvo una correlación ( $r^2 = 0.9987$ ) entre la respuesta de los TLDs en nanoCoulombs y la dosis absorbida como se muestra en la ecuación siguiente.

$$D = - 4.9E (-5) + 142.91 R_{TLD} \quad (1)$$

En esta ecuación D es la dosis absorbida en microGrays y  $R_{TLD}$  es la respuesta termoluminiscente en nanoCoulombs. Así, la dosis en función de los disparos se muestra en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Dosis en función de los disparos realizados.

Numero de disparos	Dosis absorbida (mGy)
0	0±0
5	2.28 ± 0.05
10	4.56 ± 0.09
20	9.12 ± 0.18
30	13.69 ± 0.27

### **3.3. Evaluación de la viabilidad celular (Leucocitos en sangre total)**

Para la evaluación de la viabilidad celular, se realizaron frotis sanguíneos en portaobjetos y se procedió a teñirlas con colorante de Wright (WR0505 de la casa comercial Golden Bell®). Una vez realizado lo anterior, se observaron los frotis sanguíneos en un microscopio óptico con objetivo de inmersión y se realizó un conteo de 100 leucocitos para el control y las distintas dosis de exposición (Shidham and Swami, 2000).

### **3.4. Identificación de bioindicadores (Hsp 70, Hsp 90, p53 y capasa-3)**

#### **3.4.1. Lisis celular**

Para liberar las proteínas celulares a los tubos con la sangre total luego de 40 min post-irradiación se adicionaron 500  $\mu$ L de buffer de lisis (PBS 150 mM NaCl, 2mM KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .) con inhibidor de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail Tablets in glass vials) a 4°C para luego someterlos a congelación. Al procesar las muestras estas se descongelaron, se colocaron en hielo para luego centrifugarlas a 14,000 rpm durante 10 minutos con una microcentrífuga (eppendorf), el sobrenadante fue recolectado, para medir la posteriormente la proteína total soluble.

#### **3.4.2. Cuantificación de proteínas totales**

Para determinar la cantidad de proteína total soluble se determinó el método de Bradford (Bradford, 1976), se preparó una curva estándar tomando de referencia una solución stock (1mg/ml con BSA Albumina Sérica Bovina), para nueve tubos a diferentes concentraciones (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 y 20  $\mu$ L de BSA), se completaron los volúmenes con 90  $\mu$ L de NaCl 0.15 M, se homogeneizaron. Las muestras problema fueron preparadas con 10  $\mu$ L de la proteína total soluble y 90  $\mu$ L de NaCl 0.15 M. Para todas las muestras se adicionaron 900  $\mu$ L de reactivo

Bradford a cada tubo, estos se mezclaron con un vortex, y midieron las absorbancias a 595 nm, para calcular el valor de proteína para cada una.

### 3.4.3. Western Blot

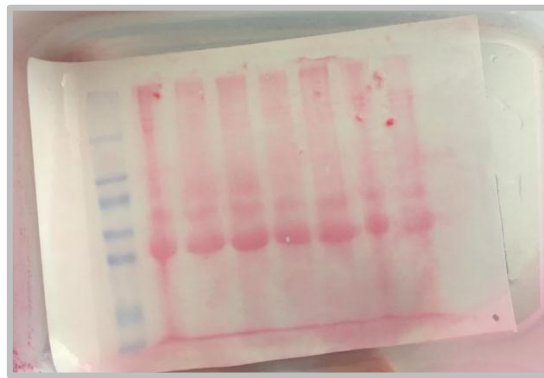
Las muestras se prepararon con 25  $\mu$ g de proteína y 10  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol para realizar la electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (**Figura 12**) al 10%, durante 90 minutos aproximadamente y a 100 volts (Towbin et al., 1979). Posterior a esto se realizó la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semi-seca, a 400 mA por 25 minutos, finalmente se tiñieron con Rojo de Ponceau (**Figura 13**) para evaluar la eficiencia del corrimiento de las proteínas, una vez observadas fueron lavadas con solución PBS 1X para retirar el colorante. Posteriormente se bloquearon las membranas de nitrocelulosa con leche al 3% durante 24 h a 4°C.



**Figura 12.** Electroforesis de proteínas en gel SDS-PAGE.

Después de ser bloqueados los sitios inespecíficos en las membranas de nitrocelulosa, se adicionó el primer anticuerpo primario correspondiente (Hsp 70, Invitrogen; p53, Sigma-Aldrich; Caspasa-8, Abcam; Caspasa-3; Sigma-Aldrich) (Dilución 1:500) por una hora a temperatura ambiente y en agitación (45 rpm), después se realizaron 5 lavados con solución PBS y PBS-TWEEN (5 min y con agitación constante de 45 rpm), después en seguida se agregó el anticuerpo secundario peroxidado (anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo para el caso de las

caspasas con dilución 1:1000) durante una hora y con agitación (45 rpm), finalmente se hicieron 10 lavados con PBS y PBS-TWEEN (5 min y con agitación contante de 45 rpm). Se realizó también la inmunodetección de la proteína tubulina como control, ya que esta es un heterodímero formado por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) que al ensamblarse de manera altamente organizada genera uno de los principales componentes del citoesqueleto, como son los microtúbulos, particularmente se utilizó el anticuerpo para  $\beta$ -tubulina de sigma a una dilución de 1:500.



**Figura 13.** Proteínas teñidas con rojo Ponceau en la membrana de nitrocelulosa.

Para revelar las proteínas, las membranas se sumergieron en una solución de Diaminobenzidina (preparada con PBS, filtrada y activada con 60  $\mu$ L de peróxido de hidrogeno) o en solución ECL (GERPN2232 - ECL™ Prime Western Blotting System) hasta identificar la señal, no excediendo los 30 min de revelado, posterior a esto la reacción fue detenida mediante el proceso de sumergir las mismas en agua destilada, fueron secadas a temperatura ambiente después de haber sido colocadas sobre hojas de papel (He, 2011).



**Figura 14.** Incubación para la inmunodetección de las membranas de nitrocelulosa.

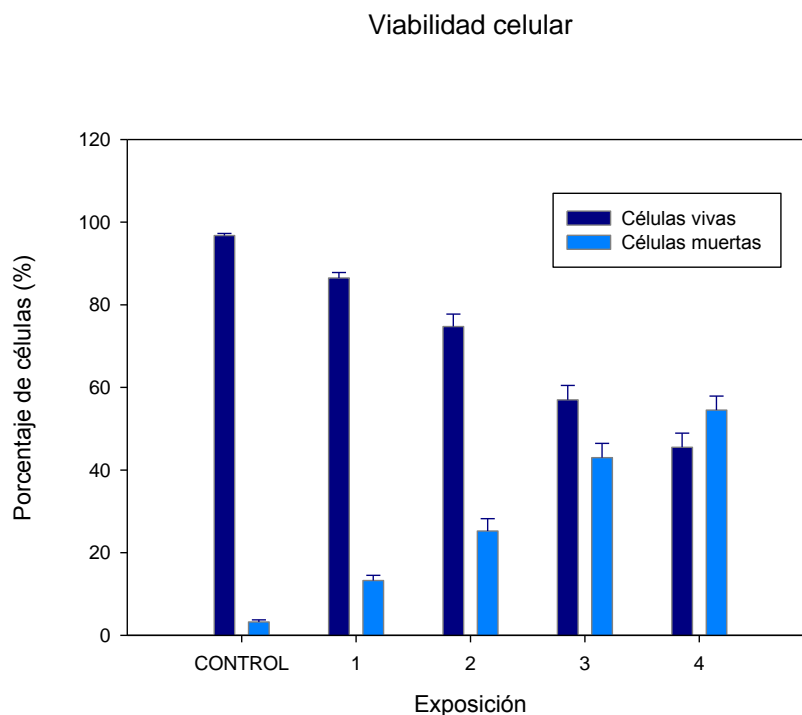
### **3.5. Identificación de cambios morfológicos celulares post-estrés**

Para evaluar la morfología celular inicial de los leucocitos en sangre total y la morfología post-estrés celular a Rayos X (Tiempo post-estrés de 40 min)), se realizaron frotis sanguíneos, que se tiñeron con colorante Wright y se observaron en un microscopio óptico con objetivo de inmersión donde se tomaron fotografías con una cámara digital (Amscope 3.1 MP) para microscopio (Shidham and Swami, 2000).

## IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Evaluación de la viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad de los leucocitos expuestos a rayos X para cada una de las muestras, se observó una disminución en el porcentaje promedio de células vivas de 97.5% a 39.5% y un aumento en el porcentaje de células muertas de 2.5% a 60.5% respecto a las diferentes dosis de exposición, donde la última dosis (13.69 mGy) presentó mayor porcentaje de células muertas como lo representa la **Figura 15**. Posiblemente esta disminución es resultado del daño celular producido, lo anterior es similar a los resultados reportados por Faraj y Mohammed (2018), donde se reporta la disminución el número de células sanguíneas para POES expuestos a rayos X.

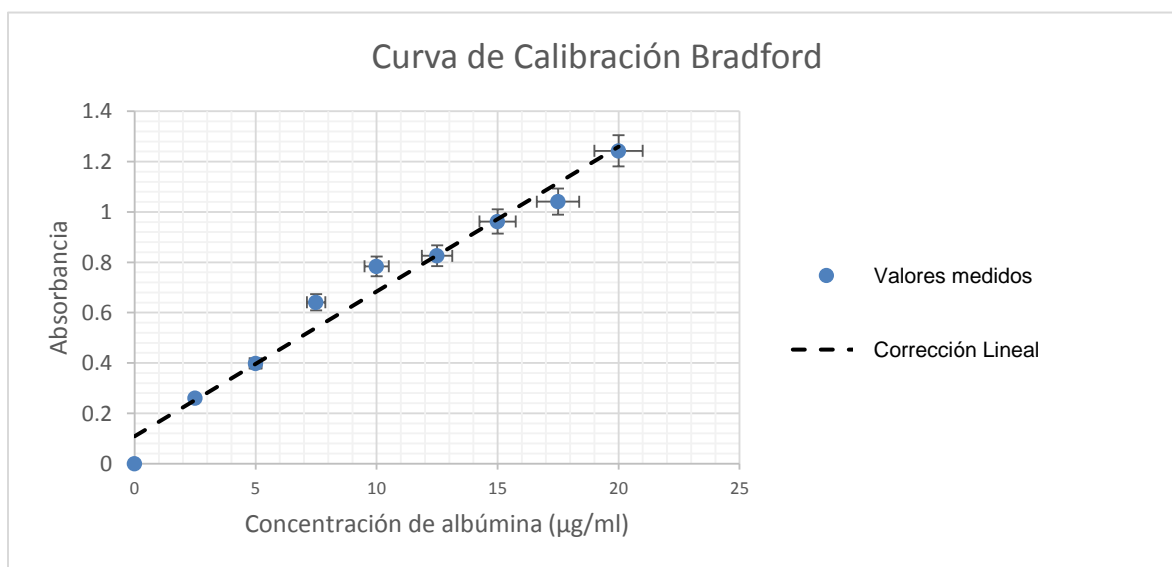


**Figura 15.** Viabilidad celular respecto a la dosis absorbida.

## 4.2. Identificación de bioindicadores (Hsp70, p53, caspasa-8 y caspasa-3)

### 4.2.1. Cuantificación de proteínas totales

Por medio de una curva de calibración la cual se observa en la **Figura 16** de concentración conocida de albumina sérica bovina se procedió a determinar la cantidad de proteínas totales solubles en cada una de las muestras, se obtuvo una correlación de  $R^2=0.9703$ , por lo que fue validada la determinación.



**Figura 16.** Curva de calibración Bradford.

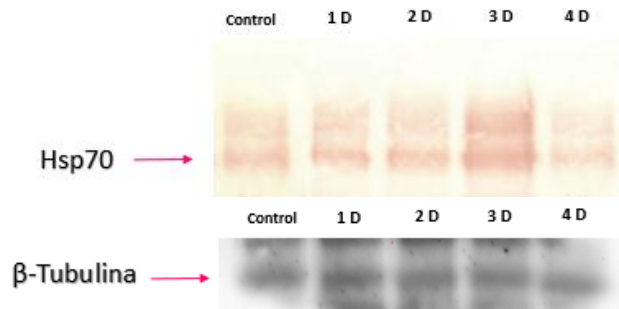
### 4.2.2. Western-blot

#### 4.2.2.1. Hsp70

Se determinó la presencia de la expresión basal de proteína Hsp70 para el control. Para las primeras dosis ( $2.28 \pm 0.05$  y  $4.56 \pm 0.09$  mGy), se observó que la concentración de la expresión se incrementó proporcionalmente a la dosis de exposición anteriores, para la tercera dosis ( $9.12 \pm 0.18$  mGy), se observó incremento de la expresión cualitativamente más significativo. Finalmente para la cuarta y última dosis ( $13.69 \pm 0.27$  mGy) la expresión disminuyó en relación al

comportamiento de expresión anteriormente mencionado, como se observa en la **Figura 17**.

En relación al comportamiento sobre la expresión de Hsp70 se demostró que esta proteína es un bioindicador de estrés celular por radiación ionizante (rayos X) como ha sido reportado por Multhoff et al., en 2015, de tal manera que los datos generados en el trabajo confirman este hecho por exposición rayos X. Datos reportados por Calini et al., (2003), (Calini et al., 2003) coinciden con esta explicación pero con otro modelo biológico como células C3H 10T1/2 cuando fueron expuestas a rayos gamma de 7.5 Gy, además con el trabajo reportado Gehrman et al., (2004), en células de carcinoma expuestas a 10 Gy en gammas.



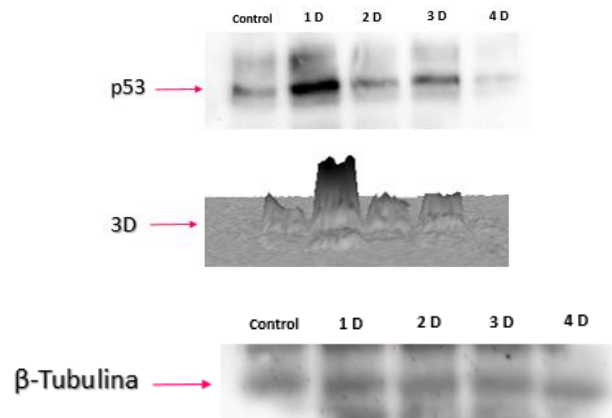
**Figura 17.** Expresión de Hsp70 en Western blot revelado con diaminobenzidina y control de β-Tubulina revelado con ECL.

#### 4.2.2.2. p53

La identificación de la presencia para la expresión basal de p53 para el control fue medida cualitativamente. El comportamiento de la expresión de p53 estableció que para la primera dosis ( $2.28 \pm 0.05$  mGy) se observó un incremento considerablemente significativo en comparación con la expresión del control, además para el resto de las exposiciones el comportamiento de la expresión disminuyó, como se observa en la **Figura 18**. Estos resultados concuerdan con las investigaciones de Hollmann et al., (2016), donde se observó un incremento de p53 en cangrejos *Ucides cordatus* expuestos a luz ultravioleta por cinco días, de Wang et al., (2016) donde se encontró un aumento de p53 en ratones expuestos a rayos gamma con una fuente de  $\text{Co}^{60}$  a dosis de 7, 8, 8.5 y 9 Gy, y Wang et al.,



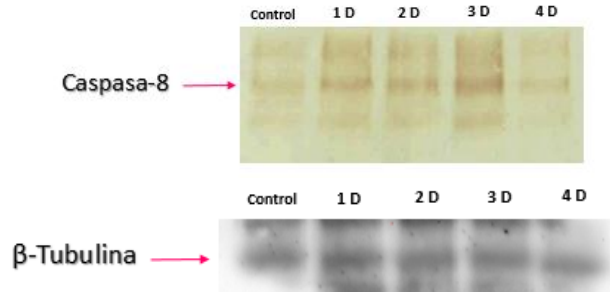
(2015) que encontró un aumento en la expresión de p53 en células intestinales de ratón expuestas a 4-8 Gy durante seis días.



**Figura 18.** Expresión de p53 por Western-blot y control de  $\beta$ -Tubulina revelado con ECL.

#### 4.2.2.3. Caspasa-8

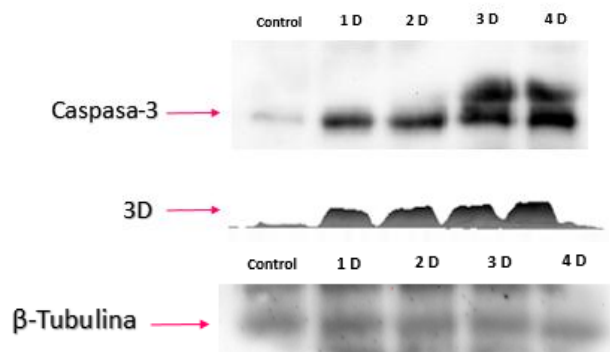
Se identificó una expresión basal de caspasa-8 para el control, para las primeras dosis ( $2.28 \pm 0.05$  y  $4.56 \pm 0.09$  mGy) esta incrementó, para la tercera dosis ( $9.12 \pm 0.18$  mGy) se observó incremento de la expresión cualitativamente más significativo. Por otro lado para la dosis más alta ( $13.69 \pm 0.27$  mGy) la expresión disminuyó lo anterior se observa en la **Figura 19**, estos resultados coinciden con los reportados por Rahmanian et al., en 2016 , donde la caspasa-8 incrementa su expresión por inducción de la radiación en diversos tipos celulares y también por Afshar et al., (2006) (Afshar et al., 2006) en células de glioma expuestas a 2.3 Gy de rayos gamma.



**Figura 19.** Expresión de caspasa-8 en Western blot revelado con diaminobenzidina y control de  $\beta$ -Tubulina revelado con ECL.

#### 4.2.2.4. Caspasa-3

Para caspasa-3 se encontró una expresión basal en el control, mientras que para las siguientes dosis la expresión incrementó paulatinamente, encontrando sobreexpresión en la tercera y cuarta dosis como lo podemos observar en la **Figura 20**, estos resultados son similares a los estudios realizados por Hollmann et al., en 2016 donde se observó un incremento de caspasa-3 en cangrejos *Ucides cordatus* expuestos a luz ultravioleta por cinco días, por Coelho et al., (2000) que observó cómo se induce la expresión de caspasa-3 al exponer células de leucemia humanas MOLT-4 a rayos-X por 6, 12, y 24 horas a una tasa de dosis de 2.5 Gy/min, y por Liu et al., en 2015 donde encontró la activación de caspasa-3 en ratones expuestos a radiación ionizante con  $\text{Fe}^{56}$  a una dosis de 0.5 Gy.



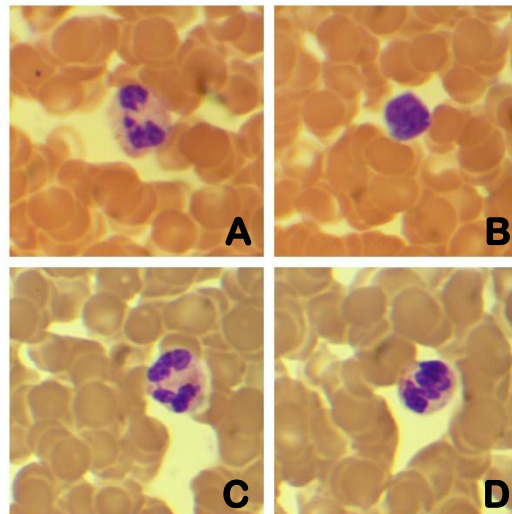
**Figura 20.** Expresión de caspasa-3 y control de  $\beta$ -Tubulina por Western-blot revelado con ECL.

### 4.3. Evaluación morfológica celular

#### 4.3.1. Controles

##### 4.3.1.1. Leucocitos con morfología normal

La morfología celular se observó con tinción Wright, una tinción de tipo Romanowsky, que consiste en azul de metileno y sus productos de oxidación, así como eosina Y o eosina B. La acción combinada de estos colorantes produce el efecto Romanowsky que da una coloración púrpura a los núcleos de los leucocitos y a los gránulos neutrofílicos, así como color rosado a los eritrocitos. Estas propiedades dependen del enlace de los colorantes a las estructuras químicas y de las interacciones del azul B y la eosina Y. Por esta razón, el azul de metileno (tiñe de color azul las partes ácidas de las células) y la eosina (tiñe las partes alcalinas) ambos disueltos en metanol (que permite la fijación de las células), y buffer de fosfatos (que rehidrata a las células después de la exposición con metanol).



**Figura 21.** Leucocitos control.

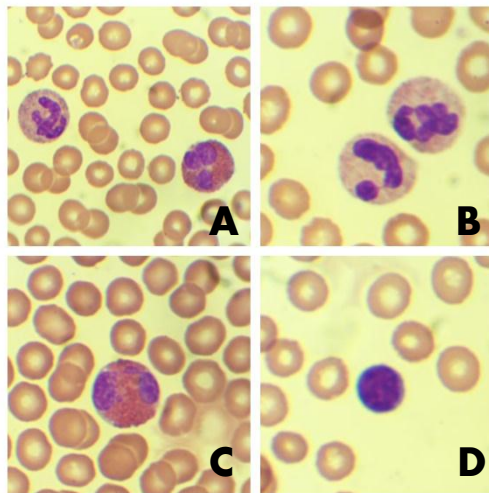
- A) Neutrófilo con morfología normal. B) Linfocito con morfología normal. C) Neutrófilo multinucleado. D) Neutrófilo multinucleado.

Los frotis con tinción Wright de los leucocitos en sangre total se muestran en las cuatro imágenes de la **Figura 21**, en donde se identifica la distribución del colorante en los diferentes cuerpos celulares de una manera homogénea, siendo éste un indicativo de células en condiciones homeostáticas normales.

Tal como lo establece Rawat (2015), la morfología característica de los leucocitos, nos indica que estas células se encuentran en condiciones normales, por lo que estas se consideraron como controles, en este estudio.

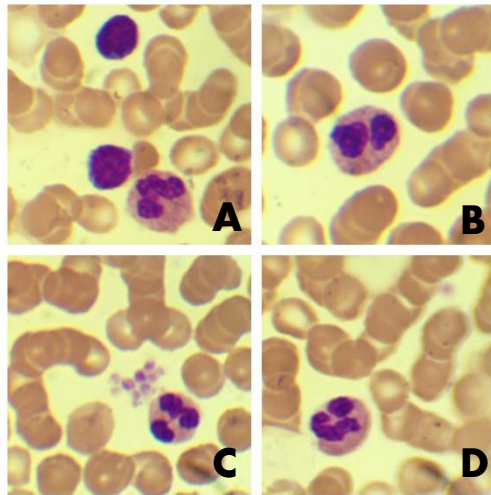
#### 4.3.2. Rayos X

Se observó un incremento en los cambios morfológicos celulares respecto a las diferentes dosis de rayos X, estos característicos del proceso de muerte por apoptosis como alteración de la membrana celular, presencia de vacuolas, citoesqueleto colapsado, condensación nuclear, fragmentación nuclear, prolongaciones en la superficie de la membrana y presencia de cuerpos apoptóticos (Martinez et al., 2010).

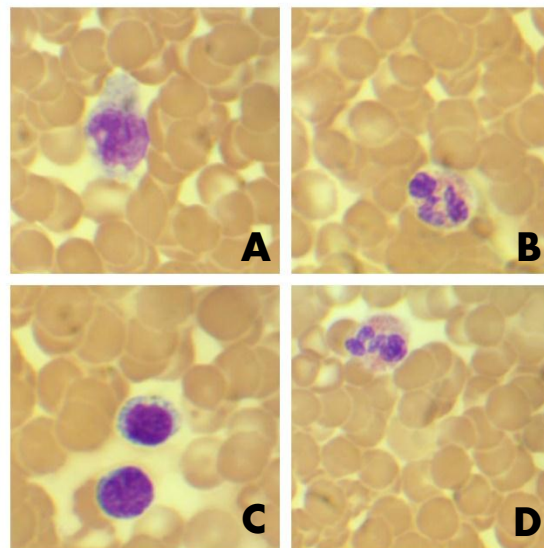


**Figura 22.** Leucocitos expuestos a la primera dosis.

A) Formación de vacuolas en neutrófilos. B) Neutrófilos con vacuolas en el citoplasma. C) Eosinófilo con presencia de vacuolas. D) Linfocito con morfología normal.



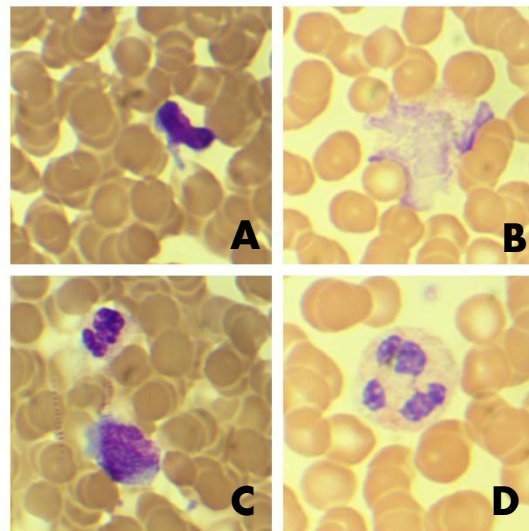
**Figura 23.** Leucocitos expuestos a la segunda dosis.  
 A) Neutrófilos y linfocitos con vacuolas y fragmentación del ADN. B) Neutrófilo con núcleo fragmentado. C) Neutrófilo multinucleado fragmentado y cuerpos apoptóticos presentes. D) Neutrófilo con su núcleo separado.



**Figura 24.** Leucocitos expuestos a la tercera dosis.  
 A) Linfocito con vacuolas y membrana celular extendida. B) Neutrófilo con vacuolas y condensación nuclear. C) Linfocitos con presencia de vacuolas así como condensación nuclear. D) Eosinófilo con fragmentación nuclear y vacuolas.

Estas características se pueden observar para cada una de las dosis en las **Figuras 22, 23, 24 y 25**. Estos cambios celulares coinciden con los reportados por

Shidman y Swami (2000), donde evaluaron los eventos celulares presentes en la apoptosis en frotis sanguíneos, con Gong et al., (2000) que observó muerte por apoptosis como respuesta adaptativa en timocitos expuestos a rayos X con dosis de 25-100 mGy y más recientemente por Miszczyk et al., (2018) que encontró muerte celular por apoptosis en linfocitos expuestos a 0.3-4 Gy con rayos X.



**Figura 25.** Leucocitos expuestos a la cuarta dosis.

- A) Linfocito prolongaciones y fragmentación nuclear. B) Cuerpos apoptóticos. C) Linfocito y neutrófilo con presencia de vacuolas así como condensación nuclear. D) Neutrófilo con fragmentación nuclear y vacuolas.

## V CONCLUSIONES

Se evaluaron los cambios en la expresión de las proteínas Hsp70, p53, caspasa-8, caspasa-3 y/o muerte celular por apoptosis en leucocitos humanos expuestos a rayos X provenientes de equipos odontológicos.

1. Los rayos X de 70 keV son un agente estresante de leucocitos humanos y el estrés se manifiesta mediante al inducción de marcadores moleculares como la Hsp70, p52, caspasa-3 y caspasa-8.
2. El porcentaje de muerte celular es dependiente al incremento de la dosis de exposición, debido al daño celular producido por exposición a rayos X.
3. Los rayos X inducen estrés celular en los leucocitos, medido a través de la proteína Hsp70 que se puede utilizar como un bioindicador del proceso mencionado. A dosis de ( $9.12 \pm 0.18$  mGy) la concentración de la sobreexpresión de dicha proteína obtuvo su mayor incremento.
4. Los datos obtenidos demuestran que la proteína p53 se sobre expresó en la primera dosis de exposición ( $2.28 \pm 0.05$  mGy), mientras que para las siguientes dosis ( $4.56 \pm 0.09$  mGy,  $9.12 \pm 0.18$  y  $13.69 \pm 0.27$  mGy) su expresión fue disminuyendo.
5. La caspasa-8 tuvo un comportamiento similar a la proteína Hsp70 presentando su pico de expresión en la tercera dosis ( $2.28 \pm 0.05$  mGy), mientras que la caspasa-3 fue incrementando su expresión respecto a la dosis de exposición presentando en las dos últimas dosis ( $9.12 \pm 0.18$  y  $13.69 \pm 0.27$  mGy) dos bandas correspondientes a la pro-caspasa y a la caspasa-3. De tal manera que estos biondicadores demuestran la presencia de muerte celular por apoptosis.

6. Se observaron cambios morfológicos característicos de muerte celular por apoptosis cuando se incrementa la dosis de exposición, este comportamiento tiene una respuesta de daño celular más significativa a dosis de ( $9.12 \pm 0.18$  y  $13.69 \pm 0.27$  mGy) además morfológicamente se observaron cuerpos apoptóticos, indicativos del final del proceso apoptótico en leucocitos por dicha exposición.



## **Trabajo a Futuro**

1. Evaluar viabilidad y daño celular por exposición a otro tipo de radiación como neutrones y gamma. Así mismo, utilizar otro modelo experimental, con la finalidad de evaluar y comparar el comportamiento en los efectos biológicos anteriores. Por consiguiente, esto permitirá generar datos significativos para las diferentes áreas de aplicaciones radiológicas.
2. Evaluar la localización celular del daño por exposición a radiaciones ionizantes por medio de la técnica de inmunofluorescencia de las proteínas bioindicadoras Hsp70, p53, caspasa-8 y caspasa-3, esto permitirá obtener información relevante del sitio específico celular ocasionado por la exposición de la radiación y relacionarlo con algunas patologías.
3. Ampliar el estudio del comportamiento del daño celular con otros bioindicadores celulares específicos, que permitan complementar la información del daño a nivel molecular y determinar un grupo de bioindicadores que identifiquen la intensidad de la respuesta del efecto por la exposición a los diferentes tipos de radiación ionizante y modelos biológicos. Esta información puede ser significativamente útil para el área de radioterapia en donde se pueden generar nuevos protocolos o modificar los existentes.

## REFERENCIAS

- AFSHAR, G., JELLUMA, N., YANG, X., BASILA, D., ARVOLD, N. D., KARLSSON, A., YOUNT, G. L., DANSEN, T. B., KOLLER, E. & HAAS-KOGAN, D. A. 2006. Radiation-Induced Caspase-8 Mediates p53-Independent Apoptosis in Glioma Cells. *Cancer Research*, 66, 4223-4232.
- AGARWAL, P., VINUTH, D. P., HARANAL, S., THIPPANNA, C. K., NITESH, N. & MOGER, G. 2015. Genotoxic and cytotoxic effects of X-ray on buccal epithelial cells following panoramic radiography: A pediatric study. *Journal of Cytology*, 32, 102-106.
- ALBERTS, D. B., KAREN HOPKIN, ALEXANDER D JOHNSON, JULIAN LEWIS, MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS, PETER WALTER 2013. *Essential Cell Biology*, New York, USA, Garland Science.
- ALS-NIELSEN, J. 2011. *Elements of Modern X-ray Physics*, United Kingdom, John Wiley & Sons, Ltd.
- BADEL, A. E., RICO-MESA, J. S., GAVIRIA, M. C., ARANGO-ISAZA, D. & HERNÁNDEZ CHICA, C. A. 2018. Radiación ionizante: revisión de tema y recomendaciones para la práctica. *Revista Colombiana de Cardiología*, 25, 222-229.
- BAUER, N. C., DOETSCH, P. W. & CORBETT, A. H. 2015. Mechanisms Regulating Protein Localization. *Traffic*, 16, 1039-1061.
- BEHLING, R. 2016. *Modern Diagnostic X-Ray Sources: Technology, Manufacturing, Reliability*, USA, Taylor & Francis Group, LLC.
- BIANCONI, E., PIOVESAN, A., FACCHIN, F., BERAUDI, A., CASADEI, R., FRABETTI, F., VITALE, L., PELLERI, M. C., TASSANI, S., PIVA, F., PEREZ-AMODIO, S., STRIPPOLI, P. & CANAIDER, S. 2013. An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Biology*, 40, 463-471.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- BRENGUES, M., LAPIERRE, A., BOURGIER, C., PÈLEGRIN, A., ÖZSAHIN, M. & AZRIA, D. 2017. T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17, 119-127.
- CALINI, V., URANI, C. & CAMATINI, M. 2003. Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicology in Vitro*, 17, 561-566.
- CANDY YUEN PING, N., SHUK HAN, C. & KWAN NGOK, Y. 2017. Effect of Photon Hormesis on Dose Responses to Alpha Particles in Zebrafish Embryos. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1-14.
- CARLOS, J., GIRALDO, R., ARBOLEDA, C. & H. MCCOLLOUGH, C. 2008. Tomografía computarizada por rayos X: fundamentos y actualidad. 2.
- CEMBER, T. E. J. 2008. *Introduction to Health Physics*, New York, NY, McGraw Hill Companies, Inc.

- COELHO, D., HOLL, V., WELTIN, D., LACORNERIE, T., MAGNET, P., DUFOUR, P. & BISCHOFF, P. 2000. Caspase-3-like activity determines the type of cell death following ionizing radiation in MOLT-4 human leukaemia cells. *British Journal of Cancer*, 83, 642-649.
- CHOUDHARY, G. S., AL-HARBI, S. & ALMASAN, A. 2015. Caspase-3 Activation Is a Critical Determinant of Genotoxic Stress-Induced Apoptosis. In: MOR, G. & ALVERO, A. B. (eds.) *Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York.
- DAVUDIANTALAB, A., FARZANEGAN, Z. & MAHMOUDI, F. 2018. Effects of Occupational Exposure on Blood Cells of Radiographers Working in Diagnostic Radiology Department of Khuzestan Province. *Iranian Journal of Medical Physics*, 15, 66-70.
- DURHAM, J. 2006. Concepts, quantities, and dose limits in radiation protection dosimetry. *Radiation Measurements*, 41, S28-S35.
- EL-SHANSHOURY, H., EL-SHANSHOURY, G. & ABAZA, A. 2016. Evaluation of low dose ionizing radiation effect on some blood components in animal model. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9, 282-293.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*, 35, 495-516.
- ERIKSSON, D. & STIGBRAND, T. 2010. Radiation-induced cell death mechanisms. 31, 363-72.
- FARAJ, K. & MOHAMMED, S. 2018. Effects of chronic exposure of X-ray on hematological parameters in human blood. *Comparative Clinical Pathology*, 27, 31-36.
- FAZEL, R., KRUMHOLZ, H. M., WANG, Y., ROSS, J. S., CHEN, J., TING, H. H., SHAH, N. D., NASIR, K., EINSTEIN, A. J. & NALLAMOTHU, B. K. 2009. Exposure to Low-Dose Ionizing Radiation from Medical Imaging Procedures. *New England Journal of Medicine*, 361, 849-857.
- FEI, P. & EL-DEIRY, W. S. 2003. P53 and radiation responses. *Oncogene*, 22, 5774.
- FEINENDEGEN, L. E. & CUTTLER, J. M. 2018. Biological Effects From Low Doses and Dose Rates of Ionizing Radiation: Science in the Service of Protecting Humans, a Synopsis. *Health Physics*, 114, 623-626.
- GALLUZZI, L., VITALE, I., AARONSON, S. A. & ABRAMS, J. M. 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25, 486-541.
- GEHRMANN, M., MARIENHAGEN, J., EICHHOLTZ-WIRTH, H., FRITZ, E., ELLWART, J., JÄÄTTELÄ, M., ZILCH, T. & MULTHOFF, G. 2004. Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death And Differentiation*, 12, 38.
- GONG, S. L., LIU, S. C., LIU, J. X., ZHANG, Y. C. & LIU, S. Z. 2000. Adaptive response of thymocyte apoptosis and cell cycle progression induced by low dose X-ray irradiation in mice. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 13, 180-188.
- HALL, J., JEGGO, P. A., WEST, C., GOMOLKA, M., QUINTENS, R., BADIE, C., LAURENT, O., AERTS, A., ANASTASOV, N., AZIMZADEH, O., AZIZOVA,

- T., BAATOUT, S., BASELET, B., BENOTMANE, M. A., BLANCHARDON, E., GUÉGUEN, Y., HAGHDOOST, S., HARMS-RINGHDAHL, M., HESS, J., KREUZER, M., LAURIER, D., MACAEVA, E., MANNING, G., PERNOT, E., RAVANAT, J.-L., SABATIER, L., TACK, K., TAPIO, S., ZITZELSBERGER, H. & CARDIS, E. 2017. Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies – An update. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 771, 59-84.
- HE, F. 2011. Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-protocol*, 1, e80.
- HENDRY, J. H. 2012. Radiation biology and radiation protection. *Annals of the ICRP*, 41, 64-71.
- HOLLMANN, G., LINDEN, R., GIANGRANDE, A. & ALLODI, S. 2016. Increased p53 and decreased p21 accompany apoptosis induced by ultraviolet radiation in the nervous system of a crustacean. *Aquatic Toxicology*, 173, 1-8.
- HORVÁTH, I., MULTHOFF, G., SONNLEITNER, A. & VÍGH, L. 2008. Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778, 1653-1664.
- HUNG, M.-C. & LINK, W. 2011. Protein localization in disease and therapy. *Journal of Cell Science*, 124, 3381-3392.
- ICRP 1991. Recommendations of the international commission on radiological protection. ICRP Publication 60, *Annals of the ICRP* 21, 1-120.
- IGNEY, F. H. & KRAMMER, P. H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2, 277.
- JOERGER, A. C. & FERSHT, A. R. 2016. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 375-404.
- KESSEL, D. 2019. Apoptosis, Paraptosis and Autophagy: Death and Survival Pathways Associated with Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 95, 119-125.
- KEWAL K., J. M. 2010. *The Handbook of Biomarkers*, New York, USA, Springer Science+Business Media.
- KIRSCH, D. G., DIEHN, M., KESARWALA, A. H., MAITY, A., MORGAN, M. A., SCHWARZ, J. K., BRISTOW, R., DEMARIA, S., EKE, I., GRIFFIN, R. J., HAAS-KOGAN, D., HIGGINS, G. S., KIMMELMAN, A. C., KIMPLE, R. J., LOMBAERT, I. M., MA, L., MARPLES, B., PAJONK, F., PARK, C. C., SCHAUE, D., TRAN, P. T., WILLERS, H., WOUTERS, B. G. & BERNHARD, E. J. 2017. The Future of Radiobiology. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, djsx231-djsx231.
- KUEFNER, M. A., BRAND, M., ENGERT, C., SCHWAB, S. A. & UDER, M. 2015. Radiation Induced DNA Double-Strand Breaks in Radiology. *Fortschr Röntgenstr and Nuclearmed*, 187, 872-878.
- LIAN, Y., XIAO, J., JI, X., GUAN, S., GE, H., LI, F., NING, L. & LIU, J. 2015. Protracted low-dose radiation exposure and cataract in a cohort of Chinese industry radiographers. *Occupational and Environmental Medicine*, 72, 640-647.
- LIN, E. C. 2010. Radiation Risk From Medical Imaging. *Mayo Clinic Proceedings*, 85, 1142-1146.

- LIU, X., HE, Y., LI, F., HUANG, Q., KATO, TAKAMITSU A., HALL, RUSSELL P. & LI, C.-Y. 2015. Caspase-3 Promotes Genetic Instability and Carcinogenesis. *Molecular Cell*, 58, 284-296.
- LOMAX, M. E., FOLKES, L. K. & O'NEILL, P. 2013. Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clinical Oncology*, 25, 578-585.
- LUMNICZKY, K., CANDÉIAS, S. M., GAJPL, U. S. & FREY, B. 2018. Editorial: Radiation and the Immune System: Current Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Immunology*, 2-8.
- MARTINEZ, M. M., REIF, R. D. & PAPPAS, D. 2010. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods*, 2, 996-1004.
- MANZANARES, E. Y VEGA-CARRILLO, H.R. (2005). Hsp como Biosímetro. Memorias de la VIII Conferencia Internacional/XVIII Congreso Nacional sobre Dosimetría de Estado Sólido, Pp 12 pags.
- MCARTHUR, K. & KILE, B. T. 2018. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends in Cell Biology*, 28, 475-493.
- MICHELIN, S., DEL ROSARIO PEREZ, M., DUBNER, D. & GISONE, P. 2004. Increased Activity and Involvement of Caspase-3 in Radiation-Induced Apoptosis in Neural Cells Precursors from Developing Rat Brain. *NeuroToxicology*, 25, 387-398.
- MISZCZYK, J., RAWOJĆ, K., PANEK, A., BORKOWSKA, A., PRASANNA, P. G. S., AHMED, M. M., SWAKOŃ, J. & GAŁAŚ, A. 2018. Do protons and X-rays induce cell-killing in human peripheral blood lymphocytes by different mechanisms? *Clinical and Translational Radiation Oncology*, 9, 23-29.
- MITCHEL, R. E. J. 2015. Adaption By Low Dose Radiation Exposure: A Look at Scope and Limitations for Radioprotection. *Dose-Response*, 1-7.
- MØLLER, A. P. & MOUSSEAU, T. A. 2016. Are Organisms Adapting to Ionizing Radiation at Chernobyl? *Trends in Ecology & Evolution*, 31, 281-289.
- MORGAN, W. F. & SOWA, M. B. 2015. Non-targeted effects induced by ionizing radiation: Mechanisms and potential impact on radiation induced health effects. *Cancer Letters*, 356, 17-21.
- MULTHOFF, G., POCKLEY, A. G., SCHMID, T. E. & SCHILLING, D. 2015. The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in radiation-induced immunomodulation. *Cancer Letters*, 368, 179-184.
- MURAKAMI, N., KÜHNEL, A., SCHMID, T. E., ILICIC, K., STANGL, S., BRAUN, I. S., GEHRMANN, M., MOLLS, M., ITAMI, J. & MULTHOFF, G. 2015. Role of membrane Hsp70 in radiation sensitivity of tumor cells. *Radiation Oncology*, 10, 1-13.
- NAGATA, S. 2018. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology*, 36, 489-517.
- O'BRATE, A. & GIANNAKAKOU, P. 2003. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resistance Updates*, 6, 313-322.
- OHTSUKA, K. & HATA, M. 2000. Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40-a review. *International Journal of Hyperthermia*, 16, 231-245.

- OLSEN SARAIVA CAMARA, N., LEPIQUE, A. P. & BASSO, A. S. 2012. Lymphocyte Differentiation and Effector Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 3.
- OTTO, T. & SICINSKI, P. 2017. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17, 93.
- PYRSHEV, K. A., KLYMCHENKO, A. S., CSÚCS, G. & DEMCHENKO, A. P. 2018. Apoptosis and eryptosis: Striking differences on biomembrane level. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860, 1362-1371.
- RAHMANIAN, N., HOSSEINIMEHR, S. J. & KHALAJ, A. 2016. The paradox role of caspase cascade in ionizing radiation therapy. *Journal of Biomedical Science*, 23, 1-13.
- RAWAT, J., BHADAURIA, H. S., SINGH, A. & VIRMANI, J. 2015. Review of leukocyte classification techniques for microscopic blood images. 2nd International Conference on Computing for Sustainable Global Development (INDIACom), 11-13 March 2015. 1948-1954.
- RITHIDECH, K. N. & SCOTT, B. R. 2008. Evidence for Radiation Hormesis after in vitro Exposure of Human Lymphocytes to Low Doses of Ionizing Radiation. *Dose-Response*, 6, 252-271.
- RÖDEL, F., FREY, B., MULTHOFF, G. & GAJPL, U. 2013. Contribution of the immune system to bystander and non-targeted effects of ionizing radiation. *Cancer Letters*, 356, 105-113.
- RÜHM, W., AZIZOVA, T., BOUFFLER, S., CULLINGS, H. M., GROSCHE, B., LITTLE, M. P., SHORE, R. S., WALSH, L. & WOLOSCHAK, G. E. 2018. Typical doses and dose rates in studies pertinent to radiation risk inference at low doses and low dose rates. *Journal of Radiation Research*, 59, ii1-ii10.
- SABIRZHANOV, B., STOICA, B. A., HANSCOM, M., PIAO, C.-S. & FADEN, A. I. 2012. Over-expression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase-independent pathways and inhibits neuronal apoptosis. *Journal of neurochemistry*, 123, 542-554.
- SARKAR, S. & ROY, S. 2017. A mini review on heat shock proteins (HSPs): special emphasis on heat shock protein70 (HSP70). *BN Seal Journal of Science*, 9, 130-139.
- SCHAUE, D. & MCBRIDE, W. H. 2012. T lymphocytes and normal tissue responses to radiation. *Frontiers in Oncology*, 2, 119.
- SEIBERT, J. A. 2004. X-Ray Imaging Physics for Nuclear Medicine Technologists. Part 1: Basic Principles of X-Ray Production. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 32, 139-147.
- SHEVTSOV, M., HUILE, G. & MULTHOFF, G. 2018. Membrane heat shock protein 70: a theranostic target for cancer therapy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373 (1738) 20160526.
- SHIDHAM, V. B. & SWAMI, V. K. 2000. Evaluation of Apoptotic Leukocytes in Peripheral Blood Smears. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 124, 1291-1294.
- SQUILLARO, T., GALANO, G., DE ROSA, R., PELUSO G., GALDERISI, U. 2018. Concise Review: The Effect of Low-Dose Ionizing Radiation on Stem Cell Biology: A Contribution to Radiation Risk. *STEM CELLS*, 36, 1146-1153.

- TANG, F. R. & LOKE, W. K. 2015. Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability. *International Journal of Radiation Biology*, 91, 13-27.
- TICHY, A., KABACIK, S., O'BRIEN, G., PEJCHAL, J., SINKOROVA, Z., KMOCHOVA, A., SIRAK, I., MALKOVA, A., BELTRAN, C. G., GONZALEZ, J. R., GREPL, J., MAJEWSKI, M., AINSBURY, E., ZARYBNICKA, L., VACHELOVA, J., ZAVRELOVA, A., DAVIDKOVA, M., MARKOVA STASTNA, M., ABEND, M. & PERNOT, E. 2018. The first in vivo multiparametric comparison of different radiation exposure biomarkers in human blood. *PLoS ONE*, 13, 1-21.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350-4354.
- TRUONG, K., BRADLEY, S., BAGINSKI, B., WILSON, J. R., MEDLIN, D., ZHENG, L., WILSON, R. K., RUSIN, M., TAKACS, E. & DEAN, D. 2018. The effect of well-characterized, very low-dose x-ray radiation on fibroblasts. *PLoS ONE*, 13, 1-16.
- TUMMERS, B. & GREEN, D. R. 2017. Caspase-8: regulating life and death. *Immunological Reviews*, 277, 76-89.
- TYBURSKI, J. B., PATTERSON, A. D., KRAUSZ, K. W., SLAVÍK, J., JR., A. J. F., GONZALEZ, F. J. & IDLE, J. R. 2008. Radiation Metabolomics. 1. Identification of Minimally Invasive Urine Biomarkers for Gamma-Radiation Exposure in Mice. *Radiation Research*, 170, 1-14.
- UBEDA, C., NOCETTI, D., ALARCÓN, R., INZULZA, A., CALCAGNO, S., CASTRO, M., VARGAS, J., LEYTON, F., OYARZÚN, C., OVALLE, M. & TORRES, B. 2015. Magnitudes y unidades para dosimetría a pacientes en radiodiagnóstico e intervencionismo. *Revista Chilena de Radiología*, 21, 94-99.
- UBEDA DE LA C, C., NOCETTI G., D., INZULZA C., A., OYARZÚN C., C. & ALARCÓN E., R. 2018. Magnitudes y unidades para dosimetría del personal ocupacionalmente expuesto en radiodiagnóstico e intervencionismo. *Revista chilena de radiología*, 24, 5-11.
- UNSCEAR 1982. Ionizing radiation: sources and biological effects 1982 report to the General Assembly, with annexes.
- VEGA-CARRILLO, H.R., MANZANARES, E., BAÑUELOS-VALENZUELA, R. 2002. Human lymphocytes response to low gamma ray doses. American Institute of Physics Conference Proceedings 630: 146-152.
- WANG, J., ZHANG, Y., ZHU, Q., LIU, Y., CHENG, H., ZHANG, Y. & LI, T. 2016. Emodin protects mice against radiation-induced mortality and intestinal injury via inhibition of apoptosis and modulation of p53. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 46, 311-318.
- WANG, X. & LI, S. 2014. Protein mislocalization: Mechanisms, functions and clinical applications in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1846, 13-25.

- WANG, X., WEI, L., CRAMER, J. M., LEIBOWITZ, B. J., JUDGE, C., EPPERLY, M., GREENBERGER, J., WANG, F., LI, L., STELZNER, M. G., DUNN, J. C. Y., MARTIN, M. G., LAGASSE, E., ZHANG, L. & YU, J. 2015. Pharmacologically blocking p53-dependent apoptosis protects intestinal stem cells and mice from radiation. *Scientific Reports*, 5, 8566.
- WESCHE, D. E., LOMAS-NEIRA, J. L., PERL, M., CHUNG, C.-S. & AYALA, A. 2005. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *Journal of Leukocyte Biology*, 78, 325-337.



# ANEXOS

## Consentimiento informado



### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE SANGRE



Este documento sirve para que el estudiante autorice la extracción de sangre, muestra que será utilizada ÚNICAMENTE con fines de investigación.

La venopunción es la técnica por la cual se perfora una vena por vía transcutánea con una aguja o catéter; el objetivo de este procedimiento es la extracción de sangre para su posterior análisis.

El protocolo de recolección de muestra de sangre se realiza en una vena visible o palpable en la región del antebrazo, procediendo a la extracción de la sangre con debidas medidas de asepsia y antisepsia. En algunas ocasiones se pueden producir algunos riesgos con este procedimiento como son: Un ligero sangrado, será necesario esperar a que cese; Aparición de un ligero hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel), el mismo que se resolverá sin tratamiento al cabo de algunos días; En casos difíciles de extracción de sangre serán necesarias otras punciones adicionales.

**Laboratorio de Biología celular y Neurobiología (Unidad Académica de Ciencias Biológicas, UAZ)**

Fecha: 12/09/18

Nombre del donador: Lucia Ortiz Luis Martin

Edad: 20

Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos.

Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra.

  
Firma del donador



## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE SANGRE



Este documento sirve para que el estudiante autorice la extracción de sangre, muestra que será utilizada ÚNICAMENTE con fines de investigación.

La venopunción es la técnica por la cual se perfora una vena por vía transcutánea con una aguja o catéter; el objetivo de este procedimiento es la extracción de sangre para su posterior análisis.

El protocolo de recolección de muestra de sangre se realiza en una vena visible o palpable en la región del antebrazo, procediendo a la extracción de la sangre con debidas medidas de asepsia y antisepsia. En algunas ocasiones se pueden producir algunos riesgos con este procedimiento como son: Un ligero sangrado, será necesario esperar a que cese; Aparición de un ligero hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel), el mismo que se resolverá sin tratamiento al cabo de algunos días; En casos difíciles de extracción de sangre serán necesarias otras punciones adicionales.

### Laboratorio de Biología celular y Neurobiología (Unidad Académica de Ciencias Biológicas, UAZ)

Fecha: 24/sep/2019

Nombre del donador: Nestor Omar Macías Salas

Edad 22

Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos.

Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra.

Firma del donador



## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE SANGRE



Este documento sirve para que el estudiante autorice la extracción de sangre, muestra que será utilizada ÚNICAMENTE con fines de investigación.

La venopunción es la técnica por la cual se perfora una vena por vía transcutánea con una aguja o catéter; el objetivo de este procedimiento es la extracción de sangre para su posterior análisis.

El protocolo de recolección de muestra de sangre se realiza en una vena visible o palpable en la región del antebrazo, procediendo a la extracción de la sangre con debidas medidas de asepsia y antisepsia. En algunas ocasiones se pueden producir algunos riesgos con este procedimiento como son: Un ligero sangrado, será necesario esperar a que cese; Aparición de un ligero hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel), el mismo que se resolverá sin tratamiento al cabo de algunos días; En casos difíciles de extracción de sangre serán necesarias otras punciones adicionales.

### Laboratorio de Biología celular y Neurobiología (Unidad Académica de Ciencias Biológicas, UAZ)

Fecha: 06/Dic/18

Nombre del donador: Paola Romo Letechipia

Edad 19

Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos.

Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra.

Firma del donador



## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE SANGRE



Este documento sirve para que el estudiante autorice la extracción de sangre, muestra que será utilizada ÚNICAMENTE con fines de investigación.

La venopunción es la técnica por la cual se perfora una vena por vía transcutánea con una aguja o catéter; el objetivo de este procedimiento es la extracción de sangre para su posterior análisis.

El protocolo de recolección de muestra de sangre se realiza en una vena visible o palpable en la región del antebrazo, procediendo a la extracción de la sangre con debidas medidas de asepsia y antisepsia. En algunas ocasiones se pueden producir algunos riesgos con este procedimiento como son: Un ligero sangrado, será necesario esperar a que cese; Aparición de un ligero hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel), el mismo que se resolverá sin tratamiento al cabo de algunos días; En casos difíciles de extracción de sangre serán necesarias otras punciones adicionales.

### Laboratorio de Biología celular y Neurobiología (Unidad Académica de Ciencias Biológicas, UAZ)

Fecha: 19/Sept/18

Nombre del donador: Jennifer Ortiz Leticia

Edad 21

Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos.

Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra.

Firma del donador





## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE SANGRE



Este documento sirve para que el estudiante autorice la extracción de sangre, muestra que será utilizada ÚNICAMENTE con fines de investigación.

La venopunción es la técnica por la cual se perfora una vena por vía transcutánea con una aguja o catéter; el objetivo de este procedimiento es la extracción de sangre para su posterior análisis.

El protocolo de recolección de muestra de sangre se realiza en una vena visible o palpable en la región del antebrazo, procediendo a la extracción de la sangre con debidas medidas de asepsia y antisepsia. En algunas ocasiones se pueden producir algunos riesgos con este procedimiento como son: Un ligero sangrado, será necesario esperar a que cese; Aparición de un ligero hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel), el mismo que se resolverá sin tratamiento al cabo de algunos días; En casos difíciles de extracción de sangre serán necesarias otras punciones adicionales.

### Laboratorio de Biología celular y Neurobiología (Unidad Académica de Ciencias Biológicas, UAZ)

Fecha: 06 diciembre 2018

Nombre del donador: Diego Alberto Dávila López

Edad 24

Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos.

Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra.

Firma del donador



## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE SANGRE



Este documento sirve para que el estudiante autorice la extracción de sangre, muestra que será utilizada ÚNICAMENTE con fines de investigación.

La venopunción es la técnica por la cual se perfora una vena por vía transcutánea con una aguja o catéter; el objetivo de este procedimiento es la extracción de sangre para su posterior análisis.

El protocolo de recolección de muestra de sangre se realiza en una vena visible o palpable en la región del antebrazo, procediendo a la extracción de la sangre con debidas medidas de asepsia y antisepsia. En algunas ocasiones se pueden producir algunos riesgos con este procedimiento como son: Un ligero sangrado, será necesario esperar a que cese; Aparición de un ligero hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel), el mismo que se resolverá sin tratamiento al cabo de algunos días; En casos difíciles de extracción de sangre serán necesarias otras punciones adicionales.

### Laboratorio de Biología celular y Neurobiología (Unidad Académica de Ciencias Biológicas, UAZ)

Fecha: 29/Marzo/2019

Nombre del donador: Kevin Sand Ramirez Davila

Edad 23

Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos.

Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra.

Firma del donador



## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE SANGRE



Este documento sirve para que el estudiante autorice la extracción de sangre, muestra que será utilizada ÚNICAMENTE con fines de investigación.

La venopunción es la técnica por la cual se perfora una vena por vía transcutánea con una aguja o catéter; el objetivo de este procedimiento es la extracción de sangre para su posterior análisis.

El protocolo de recolección de muestra de sangre se realiza en una vena visible o palpable en la región del antebrazo, procediendo a la extracción de la sangre con debidas medidas de asepsia y antisepsia. En algunas ocasiones se pueden producir algunos riesgos con este procedimiento como son: Un ligero sangrado, será necesario esperar a que cese; Aparición de un ligero hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel), el mismo que se resolverá sin tratamiento al cabo de algunos días; En casos difíciles de extracción de sangre serán necesarias otras punciones adicionales.

### Laboratorio de Biología celular y Neurobiología (Unidad Académica de Ciencias Biológicas, UAZ)


Fecha: 29/Marzo/2019

Nombre del donador: Victor Manuel Moreno Escamero

Edad 22

Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos.

Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra.

  
Firma del donador

# CURRICULUM VITAE



## Jennifer Ortiz Letechipia

Químico Farmacéutico Biólogo

Calle Dos #120-A, Fraccionamiento Boulevares

Edad: 25 años Teléfono/celular: 4921211662 E-mail: jenniferoletechipia.live.com.mx

### FORMACIÓN ACADÉMICA

2001 - 2009

**Primaria y Secundaria**  
Instituto Sebastián Cabot

2009 - 2012

**Preparatoria**  
Colegio del Centro  
★ Mejor promedio de la generación

2012 - 2017

**Químico Farmacéutico Biólogo**  
Universidad Autónoma de Zacatecas  
"Francisco García Salinas"  
★ Mejor promedio de la generación  
Cédula Profesional: 11150196

2017 - 2019

**Maestría en Ciencias nucleares**  
(Orientación terminal en medicina nuclear)  
Universidad Autónoma de Zacatecas  
"Francisco García Salinas"

### PRODUCTIVIDAD ACADÉMICA

**1er. lugar VII Parlamento de la niñez**  
**Zacatecana Zona Escolar No. 1**  
17-Febrero-2005

**Sala de sesiones del poder legislativo del**  
**estado de Zacatecas**  
15-Abril-2005

**Ponente en el VII Parlamento de la Niñez**  
**Zacatecana**  
14 y 15 Abril de 2005

**Legisladora Parlamentaria de las Niñas y los**  
**Niños de México en el Distrito Federal**  
15-Abril-2005



## PRODUCTIVIDAD ACADÉMICA

**Concurso de oratoria "JADILOP, presencia educativa constante"**

*8-Marzo-2006*

**1er. Lugar en composición literaria "JADILOP cuenta contigo"**

*14-Marzo-2006*

**Evaluación de la tercera etapa de la "Olimpiada del conocimiento" de 6º grado**

*27-Marzo-2006*

**1ra. Jornada de Investigación en Ciencias Biológicas**

*1 y 2 de Diciembre de 2016*

**III Simposio Nacional de Ciencias Químico Biológicas**

*21 al 23 de Octubre de 2015*

**V Simposio Nacional de Ciencias Químico Biológicas**

*18 al 20 de Octubre de 2017*

**Daño celular medido a través de alteraciones al ADN y cambios en la expresión de Hsp 70 en leucocitos humanos expuestos a Luz UVA y Calor**

**Consejo Zacatecano de Ciencia, Tecnología e Innovación**

*27-Octubre-2017*

**Ponencia El calor y la luz UV inducen daño al ADN en leucocitos humanos**

**Jornadas de Investigación UAZ-2017**

**XXIV Semana Nacional de Ciencia y Tecnología**

*30 al 31 de Octubre de 2017*

**Aumento en la expresión de Hsp70, Hsp90 y p53 en la piel de ratón Balb/C por exposición a radiación UVA, UVB y UVC**

**19º Seminario de investigación Universidad Autónoma de Aguascalientes**

*Mayo-2018*

**Mejor Cartel: 19º Seminario de investigación Universidad Autónoma de Aguascalientes**

**Aumento en la expresión de Hsp70, Hsp90 y p53 en la piel de ratón Balb/C por exposición a radiación UVA, UVB y UVC**

*Mayo-2018*

**DNA damage and overexpression of P53 and Hsp 70 in human mononuclear leukocytes exposed to X-rays**

**XVIII International Symposium on Solid State Dosimetry**

*24-28 de Septiembre de 2018*

**VI Simposio Nacional de Ciencias Químico Biológicas**

**Cambios morfológicos en Leucocitos humanos expuestos a luz ultravioleta y calor**

*22 y 23 de Octubre de 2018*

**Primer Lugar en calidad de asesor en el concurso de investigación científica "José Árbol y Bonilla"**

**Cambios en la viabilidad celular, daño al DNA y sobreexpresión de Hsp70 en leucocitos**

*10 de Noviembre de 2018*

**Mejor ponencia de la mesa de Ciencias Biomédicas: Hsp70 y caspasa-8 como bioindicadores del proceso apoptótico por exposición a rayos X odontológicos en leucocitos humanos"**

**20º Seminario de investigación Universidad Autónoma de Aguascalientes**

*31 de Mayo de 2019*

## IDIOMAS

**Certificado nivel A1 según el marco Común Europeo del Programa de Inglés**  
**Universidad Autónoma de Zacatecas**  
"Francisco García Salinas"  
1-Septiembre- 2007

**Certificado nivel A1 según el marco Común Europeo del Programa de Inglés**  
**Universidad Autónoma de Zacatecas**  
"Francisco García Salinas"  
12-Septiembre- 2009

**Trinity College London**  
**Grade Examination in Spoken English**  
**Entry level certificate in ESOL International (Speaking and Listening) (Entry 2)**  
A2.1 of the CEFR  
*With Distinction*  
Enero- 2010

**Nivel B2 según el marco Común Europeo del Programa de Inglés**  
**Universidad Autónoma de Zacatecas**  
"Francisco García Salinas"  
13-Junio- 2012

**TOEFL ITP**  
**Total Score 537**  
14-Junio- 2019

## FORMACIÓN COMPLEMENTARIA

**1st Poom Certificate Taekwondo**  
**World Taekwondo Headquarters (Kukkiwon)**  
**No. 09090568**  
5-Mayo- 2005

**Materias extracurriculares: Inglés, Informática, Educación Física, Antropología**  
**Colegio del Centro**  
21-Junio- 2012

**Microsoft access, Microsoft visual basic, Microsoft Power Point, Corel Draw 12, Corel Rave 3, Macromedia Flash 8, Microsoft Word y Microsoft Excel**  
**Colegio del Centro**  
20-Agosto- 2012

**Fotografía Digital**  
**Centro de Capacitación para el Trabajo Industrial Número 081**  
14-Noviembre- 2015

**Fotografía Digital Intermedio**  
**Centro de Capacitación para el Trabajo Industrial Número 081**  
2-Julio- 2016

**Excelencia Académica en la especialidad de Fotografía Digital**  
**Centro de Capacitación para el Trabajo Industrial Número 081**  
**Ciclo escolar 2015-2016**  
2-Julio-2016

**Audición piano digital**  
**Instituto Tecnológico Musical**  
16-Julio-2018  
20-Diciembre-2018  
18-Julio-2019

## CURSOS Y TALLERES

**Curso Taller: "Farmacia Clínica"**  
**Implementación y Funcionamiento de una  
central de mezclas**

**Universidad Autónoma de Zacatecas**

**"Francisco García Salinas"**

*18 y 19 de Noviembre de 2016*

**Curso Aplicaciones Biológicas para el equipo  
de espectrometría de masas**

**Universidad Autónoma de Zacatecas**

**"Francisco García Salinas"**

*15 al 30 de Junio de 2017*

**Curso Teórico-Práctico: "Introducción a la  
proteómica"**

**Universidad Autónoma de Zacatecas**

**"Francisco García Salinas"**

*9 al 12 de Octubre de 2017*