

CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE RADIACIONES X, GAMMA Y NEUTRÓNICA TÉRMICA EN SOLUCIONES DE CRISTALINO

Marcelo Ramírez Ávila (*)

† Abelardo Alarcón C. (**)

(*) *Centro de Protección Radiológica. Casilla 4821 La Paz - Bolivia*

(**) *Universidad Mayor de San Andrés*

ABSTRACT

Radiation effects have been studied irradiating porcine lens solutions with doses which ranges between 52 Gy to 1042 Gy in the case of X-rays (30 kVp), 631 Gy to 4001 Gy in the case of ^{60}Co gamma rays and 314 Gy to 7596 Gy for thermal neutrons.

The optics density time variation of solutions was determined using a SPECTRONIC 501 spectrophotometer, and with this data an equation which describes the behavior in the mentioned cases was founded.

A phenomenological model is postulated which connects the optical time variation density increment macroscopic effect with proteins concentration in the crystalline lens obtaining Relative Biological Effectiveness using the supramolecular aggregate formation due to the denaturalization and destruction of lens proteins by radiation criteria.

RESUMEN

Se estudiaron los efectos de radiaciones en soluciones de cristalino de porcinos irradiándolas con dosis que varían entre 52 Gy y 1042 Gy en el caso de rayos X (30 kVp), 631 Gy y 4001 Gy para rayos gamma del ^{60}Co y 314 Gy y 7596 Gy para neutrones térmicos.

Se determinó la variación temporal de la densidad óptica de las soluciones y con estos datos se obtuvo una ecuación que describe este comportamiento en los tres casos mencionados.

Se postula un modelo fenomenológico que relaciona el aumento macroscópico de la densidad óptica en el tiempo con la variación de la concentración de proteínas del cristalino, obteniéndose eficacias biológicas relativas utilizando el criterio de formación de agregado supramolecular a causa de la desnaturalización y destrucción de las proteínas del cristalino por efecto de la radiación.

1. HIPÓTESIS

Se plantean las siguientes hipótesis que constituyen los basamentos principales de esta investigación:

- Cualquier tipo de radiación ionizante afecta a materiales o estructuras moleculares, manifestándose en forma nociva en tejidos y/o células viva.

- Una de las formas de inducir cataratas en el cristalino ocular es la administración de dosis relativamente grandes de radiación, hecho que está totalmente corroborado y verificado cuando la irradiación se la efectúa "in vivo". Se presume también que un aumento de la densidad óptica de soluciones de cristalino irradiadas está relacionada con el fenómeno de cataratas oculares.

- Pese a la posible inexistencia de actividad celular en las soluciones de cristalino, los efectos de las radiaciones igualmente pueden expresarse fundamentalmente a nivel de estructuras moleculares, lo que a la larga podría originar el aumento de la densidad óptica en las muestras.

Finalmente, se debe indicar que el tratamiento de datos y el modelo fenomenológico postulado están basados en los resultados del trabajo experimental.

2. OBJETIVOS

Los objetivos principales de éste trabajo son:

- Verificar la existencia de variaciones a nivel macroscópico en soluciones de cristalino, causadas por efecto de radiaciones X, gamma y neutrónica térmica. También se quiere cuantificar -aunque de manera parcial- los cambios causados por la irradiación.

- Mediante un tratamiento adecuado de los datos experimentales, diferenciar la interacción de rayos X, rayos gamma y neutrones con el cristalino.

3. MÉTODO EXPERIMENTAL

3.a. Preparación de las soluciones de cristalino.

Para la preparación de las soluciones con las cuales se trabajaron, se tomaron en cuenta aspectos experimentales importantes en lo que se refiere a la investigación en Biofísica Molecular. Uno de los problemas que se encuentra en la investigación de biopolímeros (especialmente en las proteínas), es plantearse la mejor forma de tener la solución para su investigación, con lo que se debe responder a la pregunta: ¿en qué medida coincide la estructura de la molécula proteínica con su estructura biológica funcional en la disolución? Para responder esta cuestión, se debe tener en cuenta que el glóbulo proteínico tiene una estructura fijada y que las proteínas cristalinas contienen gran cantidad de agua, por lo que es mejor su estudio en la disolución madre. Los resultados de las investigaciones roentgenográficas del cristal de la proteína y los datos de las mediciones ópticas de la misma proteína en la disolución, por regla general, concuerdan bien unas con otras. En particular, coinciden los grados de espiralado, determinados por ambos métodos. También, está establecido que la actividad fermentativa de una serie de proteínas se conserva en un cristal fuertemente bañado con agua [1]. En síntesis, la respuesta a la pregunta planteada es que la estructura y funcionalidad de la proteína se conserva, siempre y cuando la solución en la que se halla sea predominantemente acuosa, pues en caso contrario, cambian su estructura y pueden sufrir desnaturalización por agentes químicos que participan en la disolución.

3.b. Obtención y conservación de los cristalinos.

Los cristalinos fueron extraídos de ojos de ganado porcino recién faenado. Los cerdos correspondían a la raza Duroc y la edad de los mismos oscilaba entre los 12 y 15 meses. Después de

la remoción, los cristalinicos fueron almacenados a -20°C hasta la hora de su utilización. Cabe señalar también que una vez que se hubo preparado la solución proteica, las muestras fueron mantenidas en congelador para su mejor conservación.

3.c. Preparación de la solución proteica de cristalino.

Para la preparación de la solución proteica, treinta cristalinicos fueron descapsulados y fraccionados en pequeños trozos a los que se añadió 150 cm^3 de disolvente (solución salina) y homogeneización durante 30 minutos. Finalmente se procedió al filtrado de la solución para eliminar la pequeña fracción de precipitado.

3.d. Irradiación de las muestras.

Las soluciones de cristalino fueron irradiadas con RX de 30 kVp, con rayos gamma de ^{60}Co y con neutrones térmicos. Se irradiaron 3 muestras para cada dosis de las diferentes radiaciones y se dejaron muestras testigo.

3.e. Medidas de densidad óptica pre y post-irradiación.

Para medir la densidad óptica de las soluciones proteicas, se utilizó el método de colorimetría que consiste en medir esta a una determinada longitud de onda y compararla con la de un medio "blanco" (en nuestro caso agua destilada) que se utiliza como patrón. El instrumento que se utilizó para realizar estas mediciones fue un espectrofotómetro "Spectronic 501".

4. TRATAMIENTO DE DATOS

En base a los datos obtenidos de densidad óptica (DO) post-irradiación de las muestras irradiadas a diferentes dosis (D), se nota en todos los casos una dependencia lineal entre DO y D de la forma

$$DO = aD \quad (1)$$

donde **DO** es la densidad óptica de la muestra.

a es un coeficiente y tiene unidades de Gy^{-1} .

D es la dosis absorbida en Gy.

También se observó una tendencia clara de la densidad óptica a estabilizarse con el tiempo, lo que sugiere que se puede tener una ecuación de ajuste para el coeficiente **a** de la forma:

$$a = b - ce^{-\lambda t} \quad (2)$$

A manera de ilustración se muestran las gráficas correspondientes a Rx.

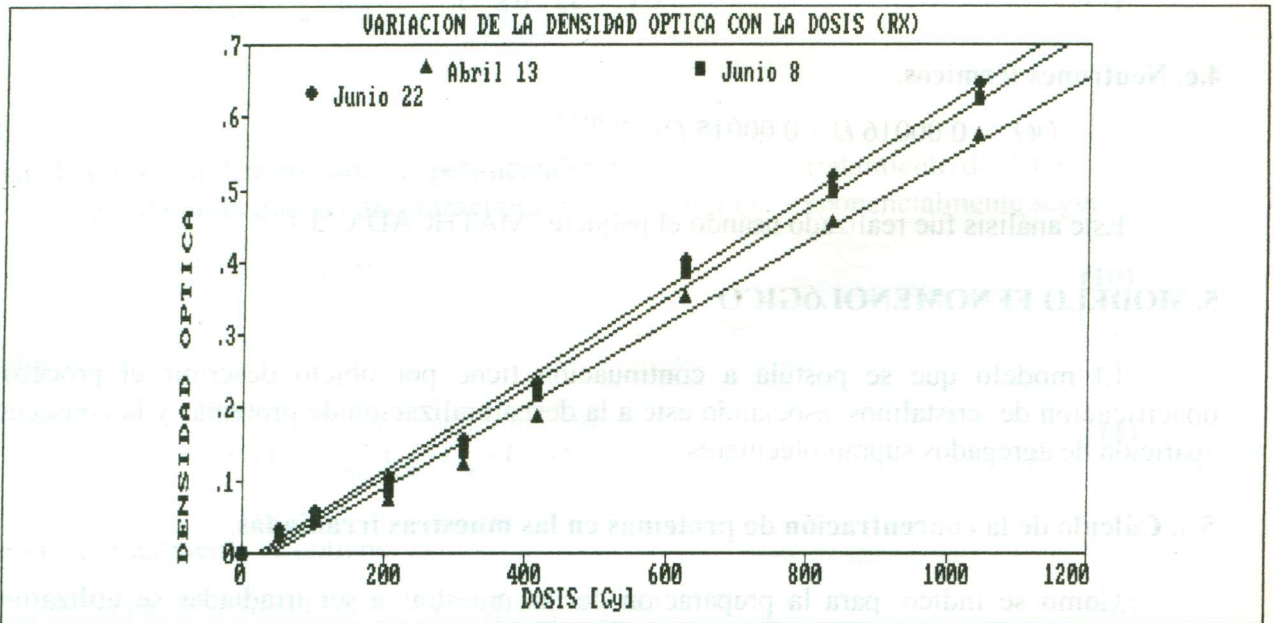


Figura 1 Regresión lineal de las densidades ópticas en función de la dosis absorbida para diferentes tiempos post-irradiación.

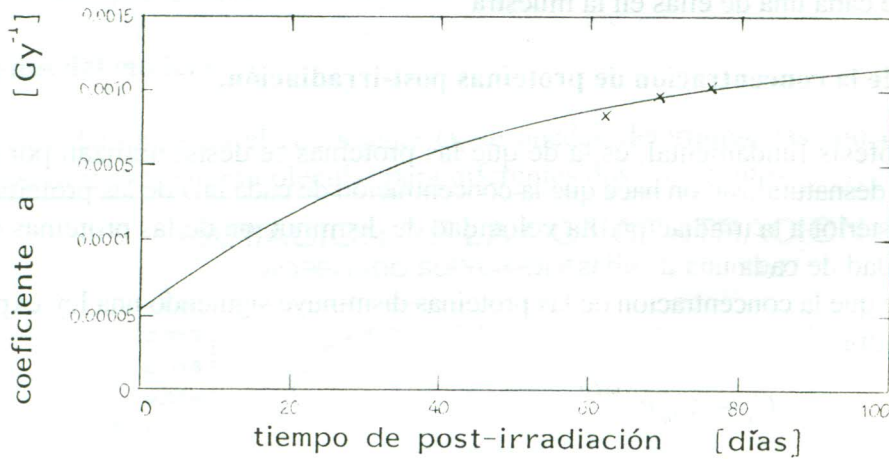


Figura 2. Ajuste de los coeficientes a en función del tiempo de post-irradiación.

Finalmente, las ecuaciones obtenidas para cada uno de los tipos de radiación son:

a. Rayos X.

$$DO = 0.00074 D - 0.00074 D e^{-0.02202t} \quad (3)$$

4.b. Rayos gamma.

$$DO = 0.00025 D - 0.00023 D e^{-0.0091t} \quad (4)$$

4.c. Neutrones térmicos.

$$DO = 0.00016 D - 0.00015 D e^{-0.01967t} \quad (5)$$

Este análisis fue realizado usando el paquete "MATHCAD v. 3.1".

5. MODELO FENOMENOLÓGICO

El modelo que se postula a continuación tiene por objeto describir el proceso de opacificación de cristalinos, asociando este a la desnaturalización de proteínas y la consecuente aparición de agregados supramoleculares.

5.a. Cálculo de la concentración de proteínas en las muestras irradiadas.

Como se indicó, para la preparación de las muestras a ser irradiadas se utilizaron 30 cristalinos descapsulados, cuya masa total y volumen de disolvente eran conocidos y considerando que el cristalino está compuesto en un 35 % de proteínas en masa [2], -cuyos pesos moleculares están determinados en forma aproximada- [3], es posible calcular el número de moléculas y la concentración de cada una de ellas en la muestra.

5.b. Variación de la concentración de proteínas post-irradiación.

Una hipótesis fundamental, es la de que las proteínas se desnaturalizan por efecto de las radiaciones; esta desnaturalización hace que la concentración de cada una de las proteínas disminuya con el tiempo posterior a la irradiación. La velocidad de disminución de las proteínas dependerá de la radiosensibilidad de cada una de ellas.

Se asume que la concentración de las proteínas disminuye siguiendo una ley exponencial [4], por lo que se tendrá:

$$C_i = C_{0i} e^{-\omega_i t} \quad (6)$$

Por otro lado, de acuerdo con un trabajo reciente [5], la razón de velocidad en la reacción fotoquímica por irradiación UV en proteínas de cristalino -y considerando que el albuminoide tiene similar radiosensibilidad a la α -cristalina- es:

$$\beta, \gamma, \alpha, a = (1.0):(1.0):(0.04):(0.04) \quad (7)$$

la cual está relacionada con los exponentes ω de las diferentes proteínas, por lo que se puede escribir:

$$\omega_\alpha = \omega_a = \omega \quad ; \quad \omega_\beta = \omega_\gamma = 25\omega \quad (8)$$

En tanto que las proteínas se desnaturalizan y disminuyen su concentración, los agregados supramoleculares formados su concentración con el tiempo en la forma:

$$C_s = (C_{p0} - C_\alpha - C_\beta - C_\gamma - C_a)(b - ce^{-\lambda t})D \quad (9)$$

donde b , c y λ son determinados experimentalmente a partir del tratamiento de datos.

Considerando que la concentración proteica disminuye exponencialmente según:

$$C_p = C_{p0} e^{-\lambda t} \quad (10)$$

también:

$$\begin{aligned} C_{p0}(t=0) &= C'_{0\alpha} + C'_{0\beta} + C'_{0\gamma} + C'_{0a} \\ C_p(t=t) &= C'_\alpha + C'_\beta + C'_\gamma + C'_a + C'_s \end{aligned} \quad (11)$$

con lo que finalmente se obtiene:

$$C_{p0}(e^{-\lambda t} + cDe^{-\lambda t} - bD) = (1 - bD + cDe^{-\lambda t})[(C'_{0\alpha} + C'_{0a})e^{-\omega t} + (C'_{0\beta} + \dots) \quad (12)$$

La determinación de ω se realiza numéricamente, con lo que queda completamente determinado el comportamiento de la variación de proteínas.

5.c. Resultados del modelo.

Una vez determinado el coeficiente ω , se pueden determinar las concentraciones de las proteínas y del agregado supramolecular para diferentes dosis y tiempos.

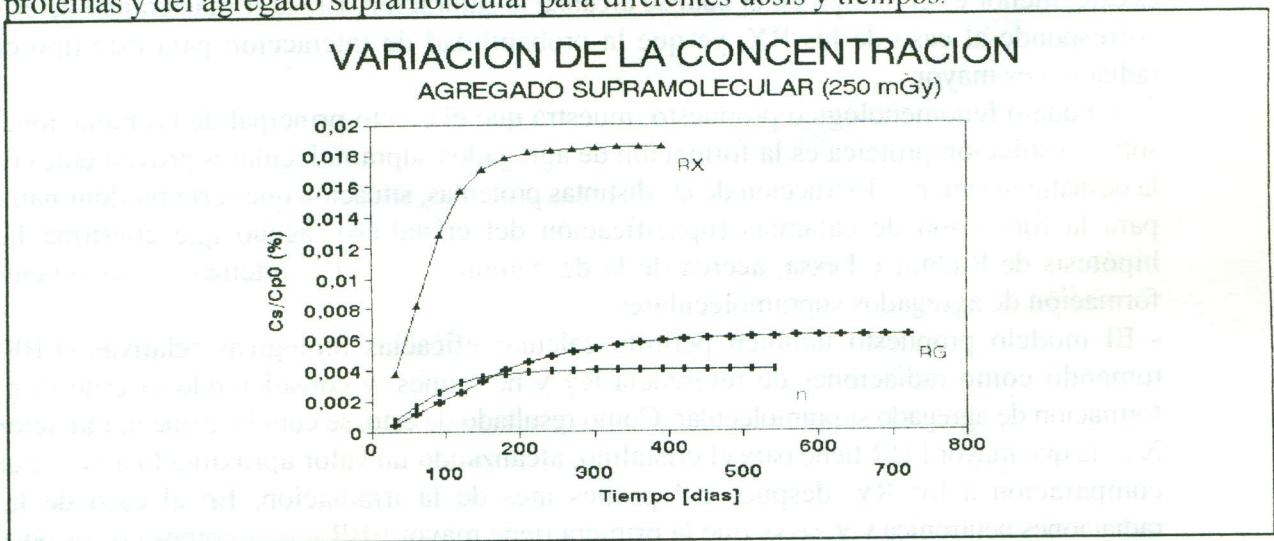


Figura 3. Variación de la concentración del agregado supramolecular comparada con la concentración de la solución proteica inicial para una dosis de 250 mGy de RX, Rg y neutrones.

Lo que determina la aparición de cataratas es el agregado supramolecular y su aumento, por lo que interesa la relación de éste con la concentración proteica. En la Fig.3 se ve este comportamiento para una dosis de 250 mGy.

Para finalizar, se puede hacer una comparación del porcentaje de agregado supramolecular formado en función del tiempo de post-irradiación y la dosis para los tres tipos de radiación utilizados, lo que está implícitamente relacionado con el concepto de eficacia biológica relativa (EBR); en este caso se considera la EBR en relación con el aumento del agregado supramolecular.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados del capítulo IV y a otros complementos de esta investigación, se pueden mencionar las siguientes conclusiones:

- La evidencia experimental muestra que los coeficientes **b** y **c** para los distintos casos son:

$$b(RX) = 0.00074 \text{ [Gy}^{-1}\text{]}$$

$$c(RX) = 0.00074 \text{ [Gy}^{-1}\text{]}$$

$$b(R\gamma) = 0.00025 \text{ [Gy}^{-1}\text{]}$$

$$c(R\gamma) = 0.00023 \text{ [Gy}^{-1}\text{]}$$

$$b(n) = 0.00016 \text{ [Gy}^{-1}\text{]}$$

$$c(n) = 0.00015 \text{ [Gy}^{-1}\text{]}$$

donde se observa que tienen un valor muy parecido, por lo tanto es posible concluir que la densidad óptica (DO) varía con el tiempo de la forma:

$$DO = k(1 - e^{-\lambda t})$$

donde **k** es una constante adimensional directamente proporcional a la dosis absorbida.

- Experimentalmente se halló que el coeficiente λ para los casos estudiados son:

$$\lambda(RX) = 0.02202 \text{ [día}^{-1}\text{]}$$

$$\lambda(R\gamma) = 0.00910 \text{ [día}^{-1}\text{]}$$

$$\lambda(n) = 0.01967 \text{ [día}^{-1}\text{]}$$

Este coeficiente es un indicador de cuán rápidamente se llega a la saturación, cuanto mayor es éste, menor es el tiempo en el cual se alcanza la saturación. El valor más grande de éste corresponde al caso de los RX, ya que la probabilidad de interacción para este tipo de radiación es mayor.

- El modelo fenomenológico propuesto, muestra que el efecto principal de las radiaciones sobre la solución proteica es la formación de agregados supramoleculares provenientes de la desnaturalización y destrucción de las distintas proteínas, situación que sería predominante para la formación de cataratas (opacificación del cristalino), hecho que confirma las hipótesis de Radnót y Lessa, acerca de la desnaturalización de proteínas y consecuente formación de agregados supramoleculares.

- El modelo propuesto también permite calcular eficacias biológicas relativas (EBR) tomando como radiaciones de referencia $R\gamma$ y neutrones, y considerando el criterio de formación de agregado supramolecular. Como resultado de esto, se concluye que la radiación X es la que mayor EBR tiene para el cristalino, alcanzando un valor aproximado a nueve en comparación a los $R\gamma$, después del primer mes de la irradiación. En el caso de las radiaciones neutrónica y γ , se ve que la primera tiene mayor EBR para tiempos cortos post-irradiación y para tiempos prolongados la EBR de la segunda resulta ser mayor.

- Observando el porcentaje de agregado supramolecular formado, se puede concluir que para las dosis de 250 mGy y 1000 mGy, al llegar a los tiempos de saturación (aproximadamente 300 días) el agregado supramolecular ya es significativo, por lo que ya se puede presentar un proceso de formación de cataratas debido a radiación.
- La concentración del agregado supramolecular debe aumentar también con la edad, pero a mucha menor velocidad que por causa de radiaciones; sería interesante cuantificar este efecto y relacionarlo con un aspecto fisiológico intrínseco y las dosis ambientales que se reciben.
- El modelo podría ser mejorado con mediciones "in vivo" para analizar la renaturalización y síntesis de proteínas después de la irradiación.
- Se plantea la posibilidad de trabajar tanto "in vivo" como "in vitro" con sustancias que atenuen el efecto de las radiaciones en el cristalino, como con sales de bendazac L-lisina como sugiere el trabajo de Pandolfo.

REFERENCIAS

- [1] VOLKENSHTEIN, M.V., "Biofísica". Cap.1-5, pp.11-189. Mir. Moscú, 1985.
- [2] OLSON, L., "Anatomy and Embriology of the Lens". Clinical Ophthalmology, Vol.1, Cap.71.
- [3] RADNOT, M., "Effects of Irradiation on the Eye Lens". Atomic Energy Review, Vol.7, N°.4, pp. 159-158. IAEA. Viena, 1969.
- [4] GUERASIMOV, YA., "Curso de Química Física". Tomo II, pp.266-279, Mir, Moscú, 1986.
- [5] HOTT, J.L., "Concentration Dependence of Transmission Losses in UV-Laser Irradiated Bovine α -, β_H , β_L - and γ -Crystallin Solutions". Photochemistry and Photobiology, Vol.57, N°.2, pp.312-317. 1993.