

Aplicaciones no nucleares de las radiaciones. Irradiación de material biológico y pequeño animal en investigación

R. Escudero

Los procesos inducidos en la materia por efectos de las radiaciones ionizantes, son aplicados en numerosos campos de la ciencia e investigación, constituyendo una tecnología que desde hace tiempo ofrece ventajas relativas en comparación con metodologías convencionales.

En la actualidad, la mayor parte de los centros de investigación biológica disponen de equipos generadores de rayos X o irradiadores gamma para su aplicación en técnicas de investigación. En la utilización de estos equipos el riesgo de irradiación suele ser prácticamente nulo debido a que dichos aparatos están integralmente blindados y disponen de sistemas de seguridad redundantes.

Además en un irradiador biológico gamma tipo A de fuente autocontenida, la fuente de radiación se encuentra inaccesible a los operadores lo que hace más seguro su manejo.

Este tipo de irradiador biológico gamma, permite la irradiación tanto de animales de experimentación como distintos tipos de muestras biológicas lo que constituye actualmente una metodología básica para el desarrollo de la investigación en campos como las enfermedades cardiovasculares y oncología.

Events induced by ionizing radiation are exploited in diverse fields of scientific research, and the application of this technology has for many years offered advantages over alternative approaches.

Most biological research institutes are equipped with X-ray or gamma ray irradiators, which are used for a number of research purposes. The risk associated with the use of this equipment is negligible, since radiation sources are effectively shielded and the apparatus is fitted with multiple safety mechanisms. In addition, in type A gamma biological irradiators with a self shielded source, the gamma emitter cannot be accessed by operators, increasing operational safety. This type of gamma irradiator can be used for irradiation of experimental animals and various kinds of tissue sample, and is a standard methodology for biological research in fields such as cardiovascular research and cancer.



ROCÍO ESCUDERO TORO

es licenciada en Ciencias Ambientales por la Universidad de Salamanca. En 2002 comienza su carrera profesional como técnico en el Servicio de Bioseguridad y Protección Radiológica del Centro Nacional de Biotecnología. Actualmente es responsable del Servicio de Bioseguridad y Radioprotección del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, donde se encarga de supervisar todas las operaciones de riesgo de los laboratorios así como la supervisión directa de la instalación radiactiva.

INTRODUCCIÓN

Aunque el foro al que tiene acceso esta publicación es el de los usuarios en el sector nuclear, nos servimos de las radiaciones ionizantes, además de en el campo nuclear, en otros como son el industrial, de la medicina, ciencia y agricultura.

En la publicación del OIEA *Safety series 102* se expone de forma resumida la utilización de las fuentes radiactivas en la industria, medicina, investigación y docencia y en otras publicaciones de dicho Organismo se describen más específicamente los usos industriales en radiología y en los irradiadores industriales.

Se pretende en este artículo dar una visión abreviada del segundo de estos usos no nucleares de las fuentes industriales, en la vertiente de investigación en el campo biológico, en los llamados irradiadores de células y animales utilizados en nuestro país ya con cierta profusión en los centros punteros de investigación biológica y biomédica.

LA IRRADIACIÓN EN INVESTIGACIÓN

En nuestros días, se ha venido observando cómo el uso de irradiadores biológicos ha pasado a ser una de las herramientas básicas para el desarrollo de las diferentes líneas de investigación en los centros de investigación biológica.

El uso de los irradiadores biológicos gamma es el más extendido en dichos centros por permitir la irradiación tanto de animales de experimentación como de distintos tipos de muestras biológicas *in vitro* tales como suspensiones celulares en tubos y cultivos celulares en placas petri, placas multipocillo y frascos.

Entre los diferentes tipos de irradiadores gamma se encuentran:

- Categoría I: Son irradiadores gamma en los que la fuente encapsulada esta fija dentro de un contenedor construido de materiales sólidos y no es posible físicamente su acceso a la fuente y cámara de irradiación por parte del personal.

- Categoría II: Son irradiadores gamma panorámicos en los que la fuente encapsulada se encuentra blindada en un contenedor construido de materiales sólidos cuando está en posición de almacén, y el acceso del personal a la sala de irradiación no se permite cuando la fuente de irradiación está fuera de la posición de almacén.

- Categoría III: Son irradiadores gamma con fuente encapsulada fija sumergida permanentemente en una piscina de agua y donde no es físicamente posible el acceso del personal a la fuente y cámara de irradiación.

- Categoría IV: Son irradiadores gamma panorámicos en los que la fuente encapsulada está sumergida en una piscina de agua cuando no está en uso y el acceso del personal a la sala de irradiación no se permite cuando la fuente de irradiación está fuera de la posición de almacén.

Características técnicas del irradiador biológico

Los irradiadores gamma que se utilizan en investigación están clasificados dentro de la Categoría I de irradiadores autónomos con almacenamiento en seco, diseñados para cubrir el rango total de aplicaciones de irradiación en investigación biológica (figuras 1 y 2).

Estos equipos, permiten irradiar tubos de ensayo, placas de cultivo, placas Petri a altas tasas de dosis y muestras que ocupen la cavidad total del irradiador con gran número de ratones, ratas etc. con rango variable desde el 1 al 100% de la tasa de dosis máxima de diseño.

Todos los modelos, que varían en tamaño de la cámara y en la actividad de fuentes radiactivas gamma a contenedor, disponen de acceso a la cámara de irradiación mediante una puerta blindada dotada de cierres de seguridad y también a través de tubos de acceso para introducción de gases, o sensores apropiados para el experimento que se realice. Con el uso de un sistema colimador, zonas seleccionadas de varios animales pueden ser irradiadas simultáneamente.

Por otro lado, la cámara de irradiación está aislada del sistema de operación de la fuente de forma que las salpicaduras que pudieran producirse pueden ser eliminadas eficazmente sin afectar al mecanismo de operación de la fuente.

Estos equipos están provisto en la mayoría de los casos con fuentes encapsuladas de Cesio-137 debido a su largo periodo de semidesintegración

de 30 años, que elimina frecuentes correcciones dosimétricas y costosas recargas, y debido a la energía de emisión (662KeV), menor que la de otros emisores como el Cobalto-60, se reduce relativamente el blindaje de la fuente. La actividad que suele utilizarse para el caso del Cesio-137 está comprendida 18,500TBq y 111TBq (500 y 3000Ci), aunque el equipo admite cargarse con hasta 444TBq (12000Ci) si fuera preciso.

Las dosis más habituales a administrar serán según los casos:

- Para animales de experimentación entre 2 y 25 Gy (200 y 2.500 rads).
- Para cultivos celulares entre 5 y 50 Gy (500 y 5.000 rads).

A la vista de las dosis indicadas y teniendo en cuenta que los tiempos de irradiación deben ser cortos al tratarse de muestras vivas, se justifica la utilización de una fuente del orden de actividad que se ha indicado, aunque hay disponible un amplio rango de fuentes de Cs-137 para cubrir los requerimientos de dosis de los usuarios.

El portafuentes, en el que las fuentes radiactivas se disponen de forma tal que la actividad se distribuya de forma graduada para producir óptimas curvas de isodosis, se sitúa en un conducto en la parte interna posterior de la cámara de irradiación, en un conducto totalmente aislado de la cámara.

Las muestras rotan delante del conducto portafuentes en diferentes ejes de giro lo cual produce por su distinta distancia a la fuente diferentes tasas de dosis.

La operación sin complicaciones, los mínimos niveles de radiación externa como así también todos sus sistemas de seguridad hacen que los irradiadores gamma puedan ser utilizados en cualquier laboratorio, incluso en áreas limpias, de acuerdo con la filosofía ALARA.

Diseño de la instalación

Estos irradiadores gamma se engloban en el grupo de equipos que presentan emisión fotónica de alta energía. Debido a que estos equipos presentan un riesgo de contaminación muy remoto por incluir fuentes radiactivas doblemente encapsuladas y con certificado de *Forma Especial*, a efectos prácticos sólo se tendrá en cuenta el riesgo de irradiación, el cual a su vez es despreciable debido a los numerosos sistemas de seguridad y blindaje que posee.

Aunque la tasa de exposición en la superficie del aparato no supera los 30 μ Sv/h, el habitáculo del irradiador

se clasifica como zona controlada con riesgo de irradiación debido a que la actividad total máxima de la fuente de Cesio-137 que puede albergar el irradiador puede llegar a ser de 111 TBq (3000 Ci). Por tanto, se dispone de la señalización correspondiente: trébol de color verde sobre fondo blanco rodeado de puntas radiales. Dicha señalización se completa en la parte superior con una leyenda indicativa al tipo de zona y en la parte inferior al tipo de riesgo (figura 3).



Figura 1. Irradiador biológico gamma.



Figura 2. Interior de un irradiador biológico gamma.



Figura 3. Señalización de dependencia del irradiador.

Al ser equipos autoblandados los elementos estructurales que conforman la sala que alberga el irradiador no necesitan estar provistos de blindaje, pero sus terminaciones se caracterizan por permitir una fácil descontaminación debido al manejo de material biológico que en ella se realiza. Únicamente el suelo del habitáculo está reforzado debido al peso de estos equipos.

A parte, mediante un monitor de área con alarma sonora y luminosa se realiza la vigilancia radiológica ambiental. Este monitor está enclavado electrónicamente con el irradiador, de tal forma que ante un pico de radiación corte el fluido eléctrico al equipo generador de radiaciones impidiendo el funcionamiento del mismo.

El acceso a la dependencia del irradiador es restringido, pudiendo acceder únicamente el personal designado y autorizado.

En este tipo de dependencias también se tiene en cuenta la instalación y revisión periódica de los medios de detección, alerta, alarma y extinción de incendios según la correspondiente normativa vigente.

TÉCNICAS Y APLICACIONES

Las operaciones habituales de irradiación de animales/muestras se realizan siempre desde la consola de control, no existiendo, por tanto, riesgo asociado a la manipulación. Estas operaciones siempre las realiza personal adscrito al Servicio de Protección Radiológica con licencia de operador o de supervisor.

La metodología consiste en situar el material/animal a irradiar frente a una fuente radiactiva lo que permite

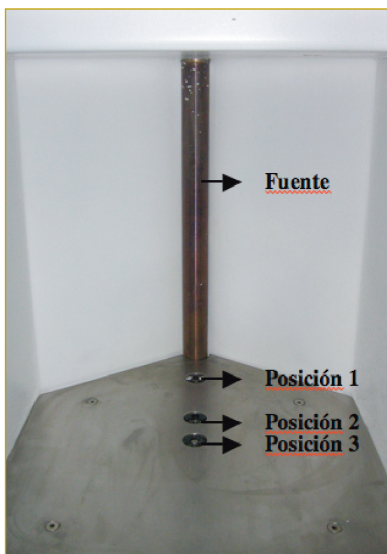


Figura 4. Posiciones de la muestra a la fuente radiactiva.

la absorción de energía (dosis) que dependerá de la actividad de la fuente, distancia del producto a la misma y del tiempo de exposición.

Es una tecnología simple y segura ya que, establecida la distancia a la fuente (posición de irradiación 1; 2 o 3) (figura 4) a la que se va a situar la muestra, lo cual se hace atendiendo a las curvas de isodosis y a la dosis que se quiere dar el único parámetro a considerar, es el tiempo de exposición necesario para alcanzar la dosis establecida, acorde con los efectos que se quieren obtener. Este simple control confiere a esta tecnología características únicas de repetibilidad y trazabilidad del proceso.

Para la obtención de una uniformidad de reparto de la dosis, el porta muestras gira durante el tiempo de irradiación, a velocidad uniforme.

Para un mejor control de las muestras el irradiador gamma dispone de varios complementos portamuestras adaptados a las necesidades de irradiación (figura 5).

Como se ha indicado anteriormente, esta tecnología constituye una metodología fundamental en investigación aplicada y se emplea con el fin de alcanzar, entre otros, los siguientes objetivos:

- Generación de animales quiméricos.
- Reconstitución de animales inmunodeficientes.
- Transferencia génica retroviral.
- Desarrollo de modelos preclínicos de terapia génica.
- Implantación de hibridomas no isogénicos.
- Mantenimiento y diferenciación de líneas celulares.
- Obtención de nuevas líneas celulares.
- Bloqueo del ciclo celular e inducción de apoptosis.
- Análisis de susceptibilidad a la radiación de líneas celulares.
- Eliminación de la hematopoyesis endógena.

A continuación se exponen algunos ejemplos de técnicas y aplicaciones de la irradiación de material biológico y pequeño animal que se están llevando a cabo en los centros de investigación.



Figura 5: Portamuestras para ratones y muestras biológicas.

Irradiación de material biológico

Células

Los fibroblastos de ratón son comúnmente utilizados para diferentes aplicaciones donde la irradiación gamma contribuye a llevar a cabo el objetivo de las líneas de investigación de interés. En este caso en concreto los fibroblastos de ratón se somete a irradiación gamma, aplicando una dosis de 10 Gy, con dos objetivos:

- *Inactivación de la proliferación celular:* la acción de la radiación produce que las células de fibroblastos se mantengan vivas pero no puedan dividirse. En este estado dichas células son utilizadas como sustrato (*feeders*), sobre el cual siembran células madres con el objetivo de mantenerlas indiferenciadas, es decir, que se caractericen por ser células madres pluripotentes.
- *Producción de medio condicionado:* en este caso al someter a los fibroblastos a la radiación, dichas células emiten al medio una serie de factores que son recolectados por el investigador para conseguir un medio de cultivo enriquecido y de interés para su posterior utilización en otros ensayos.

Irradiación de pequeño animal

Ratones

Una de las técnicas utilizadas en investigación es la irradiación de animales para el estudio de la reconstitución de animales inmunodeficientes. La irradiación de animales quimera de médula ósea (es decir, tiene una mezcla de células suyas y de las del ratón donante de médula) son importantes para estudios experimentales de la inmunidad celular y humoral (figura 6). La actividad consiste en la aplicación de una dosis letal (entorno a 9,5 Gy) (figuras 7 y 8) de tal forma

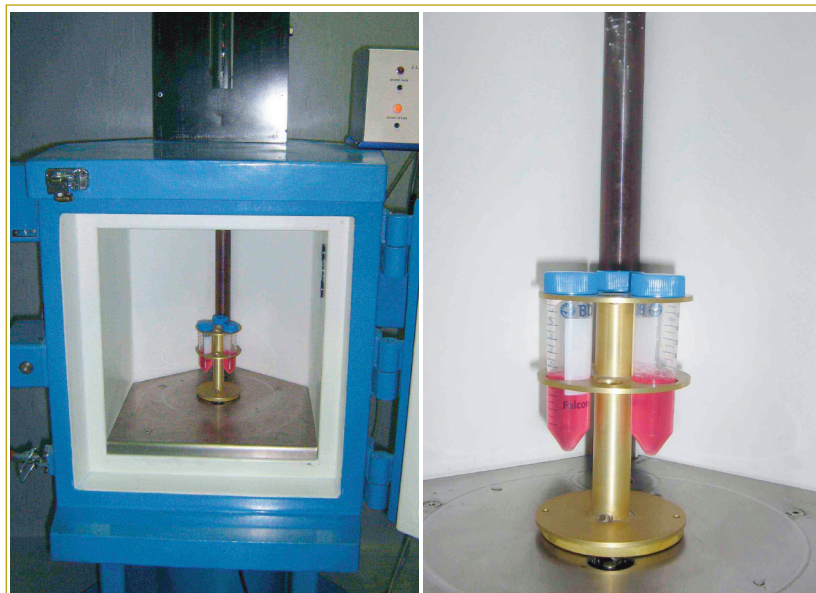


Figura 6: Preparación de las muestras de células para su irradiación.

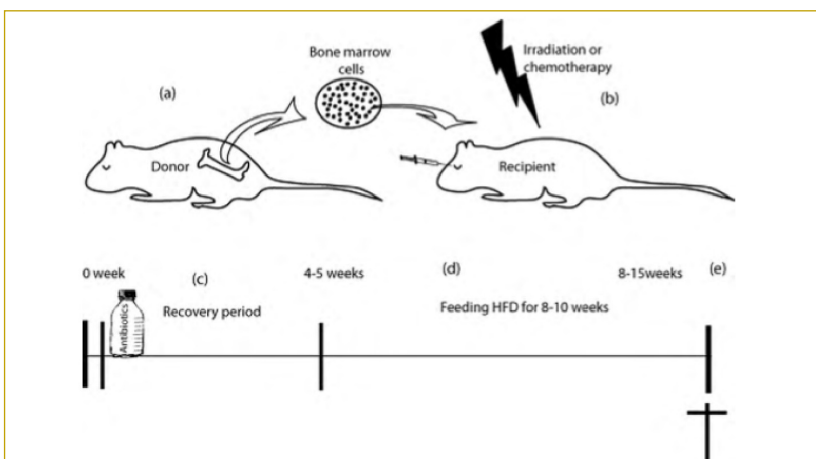


Figura 7: Representación esquemática del trasplante de médula ósea.

que las células de la médula que están proliferando (y las que están en circulación) mueren. Así se elimina el sistema inmune y el circulatorio del animal. Ese mismo día se sacrifica otro ratón del que se toma su médula ósea,

y se transplanta al ratón al que se ha expuesto a la irradiación. De esta forma el ratón recipiente es una quimera (con la irradiación no se elimina el 100% del sistema hematopoyético del animal). Con este proceso lo que se



Figura 8: Preparación de los ratones para su irradiación.

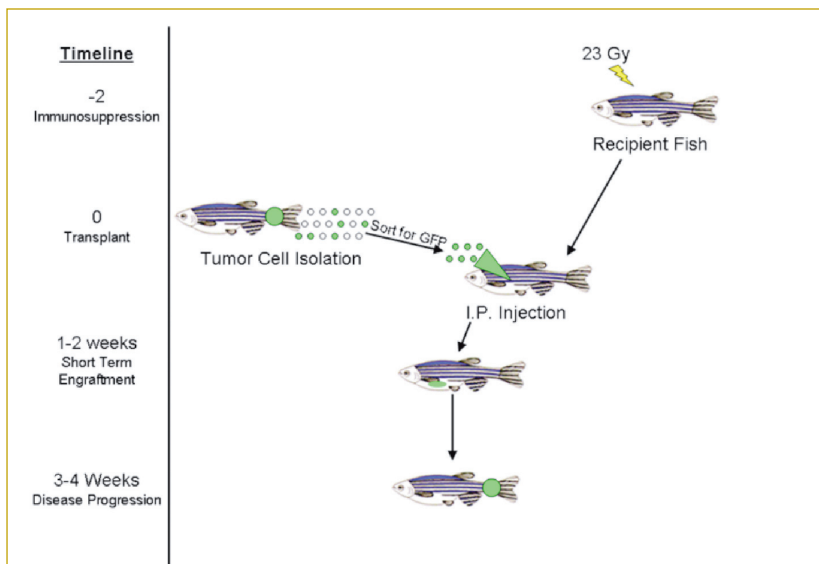


Figura 9: Representación esquemática del estudio en peces cebra.

pretende es establecer un proceso de hematopoyesis (proceso de formación, desarrollo y maduración de los componentes propios de la sangre: eritrocitos, leucocitos y plaquetas) impulsado por las células genéticamente marcadas en los animales receptores.

Después de varias semanas, se puede evaluar la presencia de células derivadas del donante en la sangre periférica o en los órganos linfoides primarios y secundarios de los receptores de trasplante. Pasado un tiempo se sacrifica a dicho animal para el estudio y análisis de los resultados de interés.

Peces

Otra de las técnicas novedosas que se están realizando en centros de investigación es el estudio de trasplante de células tumorales; especialmente importante para el ensayo de malignidad de dichas células y su capacidad de migración. También es fundamental para identificar el cáncer de supuestas poblaciones de células ma-

dre. Para este estudio se utiliza al pez cebra como modelo ventajoso para su observación (figura 9).

Una consideración importante que hay que tener en este tipo de ensayos con el animal receptor es prevenir el rechazo y por tanto permitir el injerto. Por ello la irradiación se utiliza a menudo para suprimir el sistema inmune de los peces adultos y evitar el rechazo del trasplante de las células. Las dosis que se utilizan de 20 a 25 Gy son subletales, y al menos el 90% de los peces toleran esta dosis (figura 10).

Posteriormente las células aisladas directamente de un tumor en otro pez cebra son utilizadas para el trasplante en los peces receptores inmunodeprimidos por la radiación. La observación de los animales receptores post-trasplante determinará si el injerto se ha producido. Esta es la limitación fundamental de todos los estudios de trasplante, ya que un tumor trasplantado en la cavidad peritoneal puede

no ser visible desde el exterior y aún así puede causar la muerte del beneficiario. Con un mayor desarrollo de técnicas de imagen y otras herramientas, el trasplante del tumor en pez cebra pretende seguir contribuyendo a la comprensión de la biología de las células tumorales.

REFERENCIAS

- RD.783/2001. Reglamento de protección sanitaria contra radiaciones ionizantes (2001) (modificado por RD.
- RD.1836/1999, Reglamento sobre instalaciones nucleares y radiactivas (1999). (Modificado por RD. 35/2008).
- SÁNCHEZ, A. et al. Manual de Protección Radiológica en Centros de Investigación Biológica. Sociedad Española de Protección Radiológica. SEPR no 3. Madrid. (2001).
- Aparicio-Vergara M, et al. Bone marrow transplantation in mice as a tool for studying the role of hematopoietic cells in metabolic and cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* (2010), doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.05.030.
- David A. Conner. *Current Protocols in Molecular Biology* (2000) 23.2.1-23.2.7.
- Traver D, Winzeler A, Stern HM, Mayhall EA, Langenau DM, Kutok JL, et al. Effects of lethal irradiation in zebrafish and rescue by hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2004;104:1298-1305. [PubMed: 15142873].
- Zebrafish. 2009 December ; 6(4): 339-346. doi:10.1089/zeb.2009.0607■

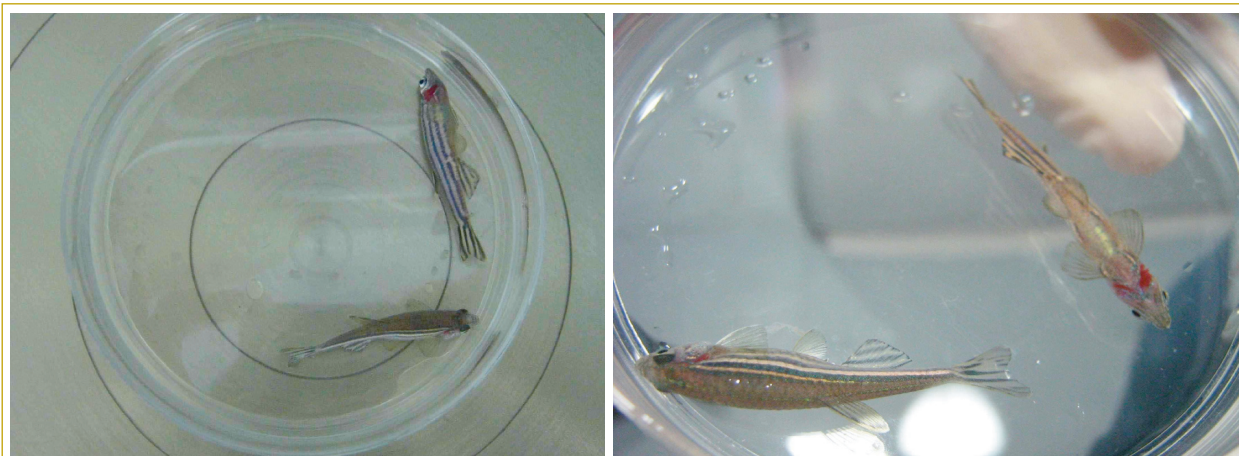


Figura 10: Preparación de los peces cebra para su irradiación.