

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Propuesta para el Diseño de un Protocolo de Irradiación de Sangre
Humana para el GC-220E**

TESIS

Para obtener el título de:

Maestría en Ciencias de la Salud

Presenta:

QB. Karla Josefina Santacruz Gómez

Hermosillo, Sonora

Julio de 2009

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar el trabajo individual escrito de la Q.B. Karla Josefina Santacruz Gómez, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

Dr. Martín Rafael Pedroza Montero
Director Académico

Dr. Guillermo López Cervantes
Secretario

Dr. César Manzano Mayoral
Vocal

Dr. Rodrigo Meléndrez Amavizca
Suplente

AGRADECIMIENTO

Les extiendo un reconocimiento a los miembros del comité de tesis por compartirme su experiencia profesional y ampliar mis horizontes en este campo; así como a todas las personas que apoyaron este proyecto. Un agradecimiento especial al CONACYT por soporte económico durante el tiempo de mi preparación académica.

Al Jefe del departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud, el Dr. Samuel Galaviz Moreno, por favorecer mi vocación científica en todo momento.

Al Coordinador del Programa, Dr. Edurardo Ruiz Bustos, por su valioso apoyo; y a Karla Zavalza por su gran paciencia y disposición.

DEDICATORIA

Con todo mi amor, respeto y admiración:

A mi padre, ejemplo de tenacidad y disciplina;

A mi madre, modelo de virtud y amor;

*Decídmelo y lo olvidaré, enseñádmelo y lo recordaré, implicadme y lo entenderé,
apartaos y actuaré.*

ÍNDICE

Lista de Tablas.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Abreviaturas.....	iii
Objetivos.....	v
Resumen.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	2
2.1. El Irradiador: Gammacell 220 Excel.....	2
2.1.1. Fuente de Emisión de Rayos Gamma.....	3
2.1.2. Ley Exponencial de Decaimiento Radiactivo.....	3
2.2. Dosimetría.....	8
2.3. Indicadores Clínicos de Calidad.....	8
2.4. Vida de Anaquel del Producto.....	9
2.4.1. Potasio Celular.....	10
2.5. Efectos Biológicos de la Radiación Ionizante.....	11
2.5.1. Mecanismos de Destrucción Morfológica Radioinducidos.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Obtención de la Muestra.....	21
3.2. Irradiación Gamma de Sangre.....	21
3.3. Tinción Giemsa.....	22
3.4. Citometría Hemática.....	22
3.5. Reacción Tetrafenilborato de Sodio.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Aspectos técnicos del Procedimiento.....	25
4.2. Efectos en la Estabilidad y Calidad de la Sangre Irradiada.....	29

4.2.1. Estabilidad Cuantitativa en Linfocitos.....	29
4.2.2. Estabilidad Morfológica en Linfocitos.....	35
4.2.3. Estabilidad Molecular en Linfocitos: Evidencia de Apoptosis.....	39
4.3. Calidad de la Sangre Irradiada: Indicador Potasio.....	41
5. CONCLUSIONES.....	45
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
7. APÉNDICES.....	54
7.1. Dosímetros Termoluminiscentes.....	54
7.2. Detector Geiger Müller.....	54
7.3. Marcadores de Superficie en Linfocitos.....	55

LISTA DE TABLAS

	Tabla	Página
I	Dosis de Irradiación Suministrada	23
II	Características de Fabricación de la Fuente	26
III	Expresión de Marcadores en linfocitos post-irradiación	40
IV	Concentración de K^+ a 72h de almacén	43

LISTA DE FIGURAS

	Figura	Página
1	Características del GC-220E	4
2	Fuente del GC 220-E	5
3	Decaimiento Radiactivo del ^{60}Co	6
4	Bomba de Sodio Potasio	11
5	Mecanismos de Acción Directa e Indirecta	13
6	Cambios Morfológicos Mitocondriales	17
7	Ejemplo de Cálculo de Dosis-Tiempo	28
8	Conteo Relativo de Linfocitos en Sangre Periférica	31
9	Conteo Relativo de Linfocitos en Población Promedio	32
10	Conteo de Linfocitos a 3 días de almacén a 4°C	33
11	Mecanismos de Destrucción Morfológica Radioinducidos	36
12	Frecuencia de Defectos Morfológicos por 100 Células	38
13	Determinación de K^+ Sérico en Sangre Irradiada	42
14	Modo de Detección del Geiger Müller	56
15	Marcadores de Superficie en Linfocitos	57

ABREVIACIONES

AABB	Asociación Americana de Bancos de Sangre
ABP	Adivina-biotina-peroxidasa
ATP	Adenosín trifosfato
CaF ₂	Fluoruro de Calcio
CH	Citometría hemática
Cl ⁻	Ión cloruro
DPG	Dipropilenglicol
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EICH-PT	Enfermedad de injerto contra huésped post-transfusional
GC-E220	Gammacell Excel 220
GGIBC	Guía para la Irradiación Gamma de Sangre y sus Componentes.
Gy	Gray
IHQ	Inmunohistoquímica
LACIUS	Laboratorio de Análisis Clínico de la Universidad de Sonora
MeV	Mega electrón volt
mmol/L	micromoles por litro
mL	Mililitro
Na ⁺	Ión Sodio
OH ⁻	Anión hidroxilo
OPS	Organización Panamericana de la Salud
K ⁺	Ión Potasio
KeV	Kilo electrón Volt

RRLAPGIBP Recomendaciones de mejoramiento y procedimientos de obtención de licencia para la irradiación gama para los productos de la sangre

pH	Potencial de Hidrógeno
s	segundos
TL	Termoluminiscente
$T_{1/2}$	Tiempo de vida media
□	Constante de desintegración
^{60}Co	Cobalto-60
^{60}Ni	Níquel-60
°C	Grado centígrado

OBJETIVOS

Todo protocolo de irradiación de sangre debe incluir indicadores de la calidad del producto irradiado y aspectos técnicos del procedimiento, tales como reconstrucción de dosis y descripción del irradiador. De acuerdo a la norma ISO 9000 se define la calidad como el grado en el que un conjunto de características inherentes cumple con los requisitos. Así, los requisitos de calidad de la sangre irradiada para uso terapéutico dependen de su estabilidad celular y de anaquel.

Objetivo General

Proponer el diseño de un protocolo de irradiación de sangre humana para el GC- 220E.

Objetivos Específicos:

1. Establecer un manual técnico del procedimiento que contenga los aspectos técnicos de la irradiación y el cálculo de dosis.
2. Estimar la estabilidad cuantitativa *in vitro* de linfocitos en las muestras por medio de la citometría hemática (CH).
3. Observar los efectos morfológicos de destrucción leucocitaria radioinducidos a 0, 25 y 50Gy por medio de la tinción Giemsa.
4. Evaluar la expresión de marcadores moleculares en linfocitos para determinar la evidencia de muerte celular en linfocitos, usando la técnica inmunohistoquímica estreptavidina-biotina-avidina.
5. Determinar la estabilidad de anaquel de la sangre irradiada considerando la concentración de potasio sérico como indicador de deterioro celular en la reacción tetrafenilborato de sodio.

RESUMEN

La transfusión sanguínea es una necesidad permanente y por la frecuencia con la que se practica es importante que deba garantizarse su seguridad para evitar los efectos colaterales. Uno de ellos, dentro de la categoría de reacciones inmunológicas adversas, es la enfermedad de injerto contra huésped post-transfusional (EICH-PT), que se desencadena debido a la presencia de linfocitos viables del donador que proliferan en el huésped creando una serie de eventos clínicos de gravedad variable, con altos índices de mortalidad.

La irradiación γ es la única técnica disponible capaz de prevenir la EICH-PT, sin embargo, y dependiendo del tipo de irradiador usado, se ha revelado una amplia variación en las dosis utilizadas, indicadores clínicos y control de calidad.

El objetivo de este estudio fue proponer el diseño de un protocolo de irradiación de sangre humana para el GC-220E, que asegure la calidad y estabilidad de este producto para uso terapéutico. La calidad se evaluó mediante los cambios morfológicos radioinducidos usando la tinción Giemsa, y su relación con la expresión del p53 para apoptosis, así como las concentraciones de linfocitos por medio de la CH. Finalmente, se analizó su estabilidad al almacén determinando las concentraciones de potasio sérico usando la reacción tetrafenilborato de sodio.

En nuestros resultados se puntualizan los pasos técnicos a seguir en el proceso de irradiación y cálculo de dosis para el GC-220E. En el aspecto de calidad y estabilidad del producto irradiado se encontró que la radiación γ induce en los leucocitos al menos tres mecanismos de destrucción morfológica: (1) pérdida de la integridad celular en linfocitos a dosis en el rango de 3.21 a 10.29Gy; (2) fragmentación leucocitaria entre los 20 y 50Gy en mayor medida (3); y disociación lobular en neutrófilos a dosis mayores de 50Gy. Estos cambios morfológicos estuvieron acompañados por un incremento progresivo en las concentraciones de potasio sérico, reduciendo la vida de anaquel del producto irradiado a 48 horas a 4°C. Finalmente se demostró que la expresión del gen p53 aumenta con respecto a la dosis, lo que indica que estas lesiones inducen la muerte celular por apoptosis en la totalidad de las células linfocitarias a 25Gy.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de injerto contra huésped post-transfusional (EICH-PT), asociada a una alta mortalidad de 80-90% (*Ohto et al, 1996*), consiste en un conjunto de manifestaciones clínicas e histológicas provocadas por la reacción de células linfocitarias inmunocompetentes del tejido trasplantado (injerto) que interactúan con tejidos de un receptor inmunosuprimido (huésped), originando lesiones en el mismo (*Jones et al, 1992*).

La fisiopatogénea de esta enfermedad incluye la presentación antigénica, la activación de los linfocitos T del injerto así como proliferación y diferenciación de estas células activadas. Cuando las células CD4+ y CD8+ ingresan al torrente sanguíneo, interactúan con las células presentadoras de antígeno; si existen diferencias en el complejo mayor de histocompatibilidad las células del injerto proliferan atacando diversos órganos (piel, hígado y especialmente médula ósea) del receptor (*Parshuram et al., 2002*).

Para prevenir esta enfermedad se recomienda la irradiación de componentes sanguíneos (AABB, 1995; CSTM, 1997). Las guías existentes son limitadas y la mayoría de las instituciones utilizan protocolos derivados de la experiencia local. Sin embargo todos coinciden en un conjunto de recomendaciones encaminadas a describir el procedimiento y el control de calidad utilizado (RLAPGIBP, 1993). Estas recomendaciones se basan en describir la dosis de radiación suministrada, los efectos en los componentes sanguíneos y en el irradiador utilizado (GGIBC, 2003).

En nuestra propuesta, el equipo utilizado para la irradiación de sangre es el Gammacell 220 Excell (GC-220E) de MDS Nordion, por lo tanto iniciaremos con describir sus características.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 El Irradiador: Gammacell 220 Excel

El Gammacell 220 Excel (GC-220E) de MDS Nordion es un irradiador gamma autónomo. Se encuentra autoblandado y puede funcionar con seguridad por los operadores que han recibido el entrenamiento apropiado como personal ocupacionalmente expuesto (POE). Los sistemas de blindaje (con una gruesa capa de plomo) y de seguridad incorporados en la unidad se diseñaron para proteger al usuario contra concentraciones dañinas de radiación, pues la exposición a una fuente sin blindaje puede causar consecuencias serias a la salud o incluso la muerte.

La unidad consiste en las fuentes anulares, incluidas permanentemente dentro de un protector del plomo, de un cajón cilíndrico que lleve muestras a y desde la posición de la irradiación, y de un mecanismo de arrastre para mover el cajón hacia arriba o hacia abajo a lo largo de la línea central vertical de la fuente. El compartimiento, contenido dentro del cajón, puede acomodar muestras hasta aproximadamente 15cm de diámetro y 20cm en altura. Contiene un tubo de acceso en la porción superior del cajón un contador de tiempo digital eléctricamente accionado que señala automáticamente la terminación de la irradiación de la muestra.

El GC-220E pesa 3856kg desensamblado. El protector principal de blindaje contiene aproximadamente 2.718kg de plomo y proporciona una protección cerca de 25.4cm de grueso. Un agujero circular que funciona verticalmente a través del centro del protector contiene el enchufe principal interno, al ensamblador de la jaula de la fuente, y al cajón móvil. La porción delantera se abre por dos puertas cada uno con bisagras a la porción posterior del collar. Una palanca detrás de la manija en la puerta a la derecha levanta un cierre y permite que las puertas traslapadas sean abiertas. El acceso al compartimiento de la muestra, a través de las puertas, es solamente posible con el enchufe superior blindado (fig. 1). El enchufe principal interno es un cilindro blindado con acero inoxidable que cabe en la cabeza sobre la jaula de la fuente.

2.1.1 Fuente de Emisión de Rayos Gamma

La caja de la fuente, situada en el centro principal blindado, está ubicada directamente debajo del enchufe principal interno. La caja de acero inoxidable contiene 48 posiciones del lápiz en las cuales un mínimo de ocho fuentes doblemente encapsuladas (21.11 cm), se fijan de largo en una formación anular de 20.90cm de diámetro. Cada lápiz tubular contiene siete lingotes de Cobalto-60 (fig. 2), sellados totalmente dentro por los casquillos de extremo soldados con autógena (*Operator's manual IN/OM 1894 GC-220E*).

El Cobalto-60 (^{60}Co) es un isótopo radiactivo del Cobalto, con una vida media de 5.261 años. Decae por desintegración beta al isótopo estable Níquel-60 (^{60}Ni), y en el proceso de desintegración, emite un electrón con una energía de 315 keV y luego dos rayos gammas con energías de 1,17 y 1,33 MeV, respectivamente (fig. 3).

La actividad de una muestra radiactiva es el número de desintegraciones que ocurren en la misma por unidad de tiempo. La variación en la actividad de una muestra $A(t)$ y el número de radionúclidos presentes $N(t)$ conforme pasa el tiempo se conoce como ley exponencial del decaimiento radiactivo.

2.1.2. Ley Exponencial de Decaimiento Radiactivo

La ley exponencial de decaimiento radiactivo se puede deducir partiendo del hecho de que la actividad de una muestra radiactiva es proporcional al número de radionúclidos contenidos en la misma.

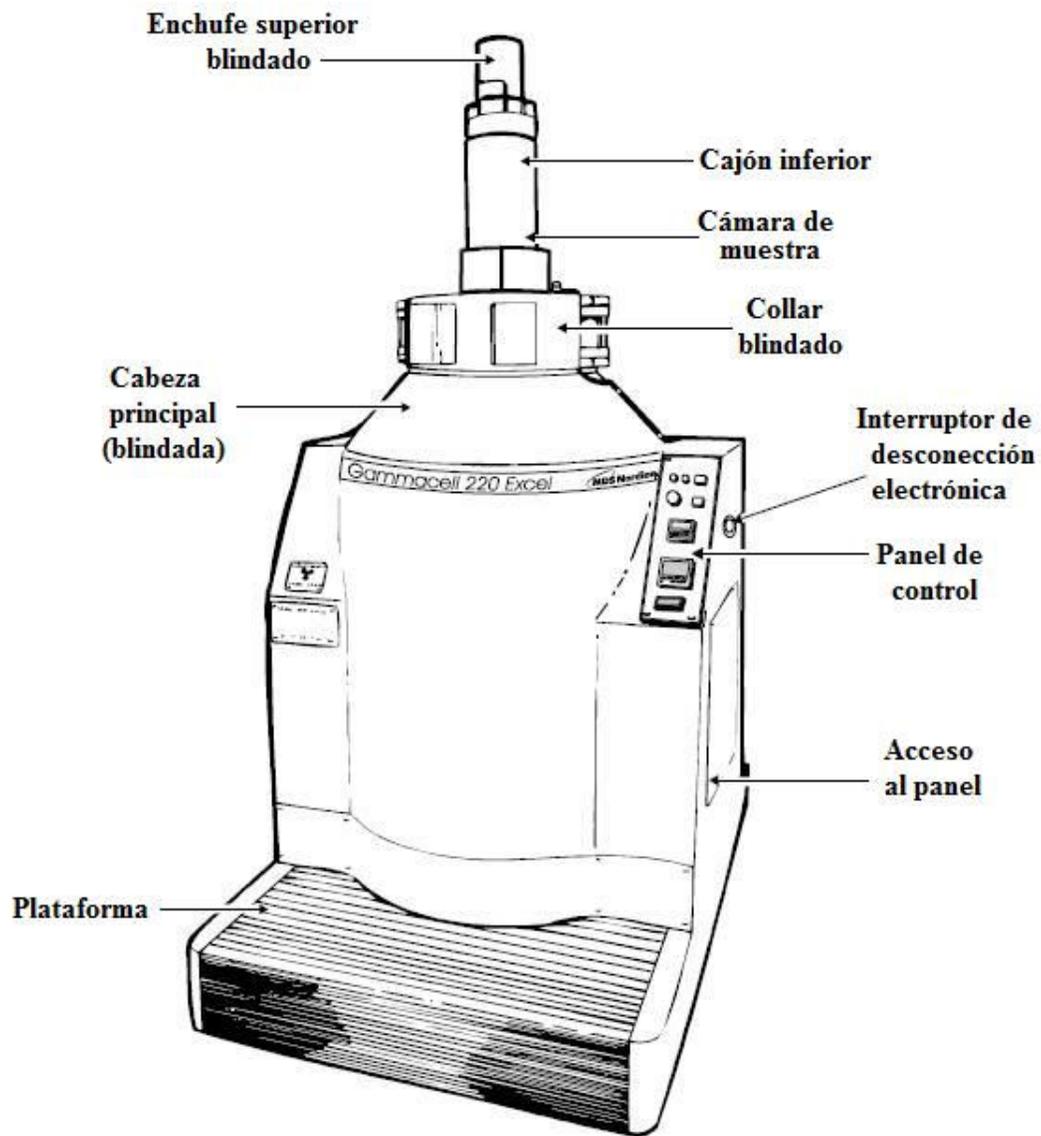


Figura 1. Características del GC-220E.

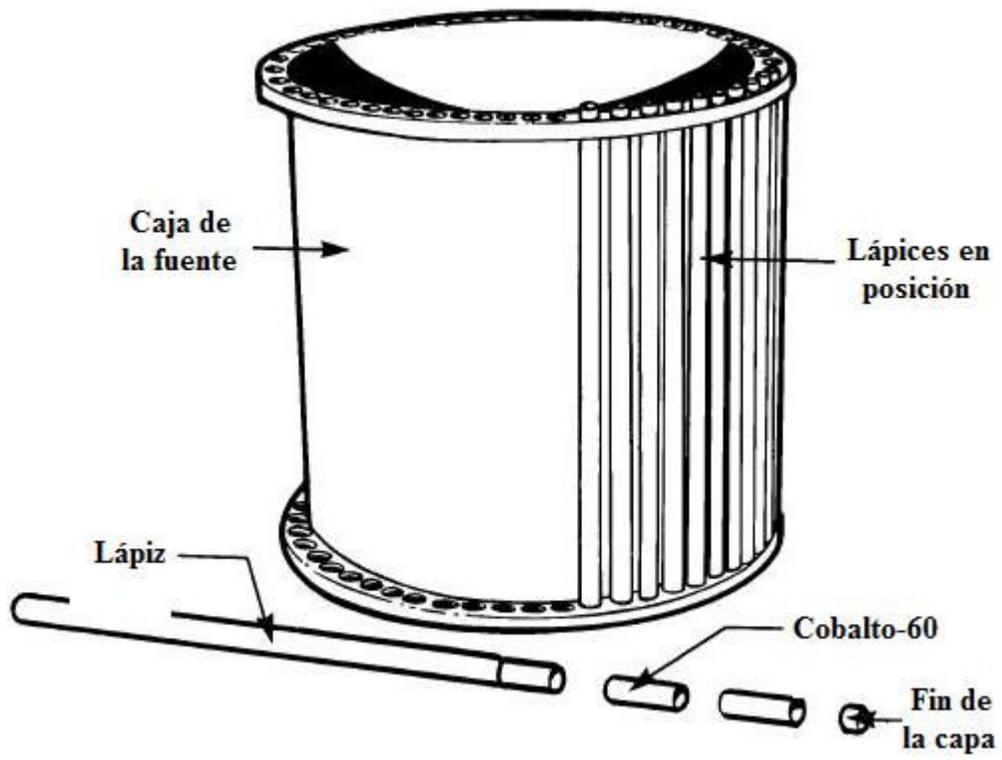


Figura 2. Caja y fuente del GC 220-E.

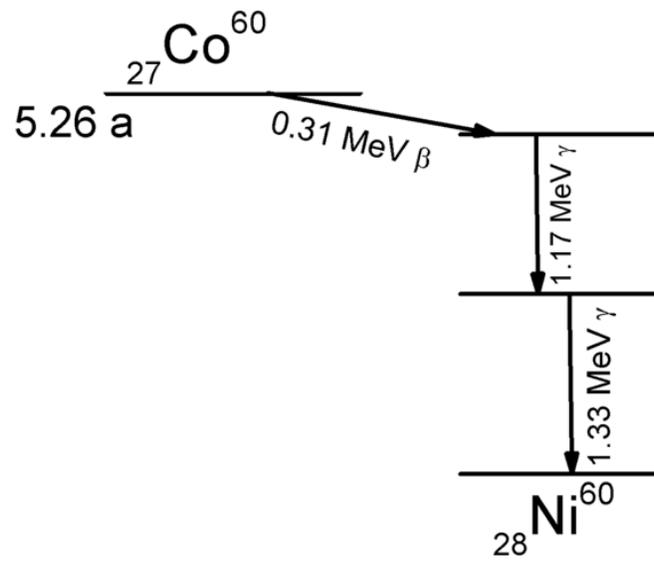


Figura 3. Decaimiento radiactivo del ^{60}Co .

Decaimiento Beta del Cobalto-60, HyperPhysics, Georgia State University.

La constante de proporcionalidad λ , también llamada constante de decaimiento, corresponde a la fracción del número de núclidos presentes en la muestra en cualquier instante que se desintegran en la unidad de tiempo:

$$A(t)=\lambda N(t) \quad \text{ó} \quad \lambda=0.693/T_{1/2}$$

Esta constante de decaimiento es característica para cada tipo de radionúclido y su valor no se ve afectado por el estado físico o químico de la muestra (fuente). Al combinar la ecuación de actividad y la de constante de decaimiento, tenemos la exponencial de decaimiento para el número de radionúclidos:

$$N=N_0e^{-\lambda t}$$

Donde N_0 es igual al número de radionúclidos presentes inicialmente en la muestra. Al sustituir el valor de N en la ecuación de 1 se obtiene la relación correspondiente a la actividad:

$$A=A_0e^{-\lambda t}$$

Si ajustamos esta fórmula a la dosis absorbida, tenemos:

$$*D=D_0e^{-\lambda t}$$

De esta forma podemos calcular la rapidez o tasa de dosis absorbida ($*D$) en una muestra al momento actual considerando la dosis absorbida inicial. Una vez calculada la dosis, así como en protección radiológica, es importante poner en manifiesto la dosis absorbida mediante procedimientos físicos, químicos o biológicos.

2.2. Dosimetría

La dosimetría intenta fijar las magnitudes y unidades adecuadas para estimar de la manera más completa posible los fenómenos que la radiación induce en la materia. (*Ortega-Jorba, 2000*). El ser humano no dispone de sensores biológicos para detectar la presencia de radiación ionizante y por lo tanto depende totalmente de la instrumentación para conocer los niveles de radiación que le rodean, estos instrumentos son conocidos como dosímetros.

En este caso se manejarán dos tipos de dosimetría: la personal y la del área de trabajo. Los dosímetros personales tienen el objetivo medir la dosis recibida por el personal ocupacionalmente expuesto (POE) a la radiación. De acuerdo a la legislación vigente, se debe medir en forma periódica la dosis del dosímetro personal, cambiándolo cada vez que es medido. En este caso en el Laboratorio de Física de Radiaciones de la Universidad de Sonora se utiliza un dosímetro termoluminiscente (TL) (anexo 7.1); por otro lado para monitorear fugas de radiaciones o radiación libre en el área de trabajo se usa el contador Geiger Müller (*Zeits, 1937; Minakawa, 1943*), anexo 7.2.

Por otro lado, la dosimetría biológica es la técnica que permite estimar el grado de exposición a la radiación a través de la valoración de los efectos biológicos ocasionados. Generalmente estos estudios se realizan por medio del análisis citogenética de linfocitos de sangre periférica estudiando las aberraciones cromosómicas en individuos expuestos.

2.3 Indicadores Clínicos de Calidad

El uso de la irradiación γ para prevenir la EICH-PT tiene el objetivo de inactivar las células T linfocitarias y conservar el resto de las células sanguíneas fisiológicamente intactas (*Chapman et al., 1996*), por lo tanto las modificaciones en ellas se han considerado indicadores clínicos de la calidad de la sangre irradiada.

En células rojas. Las concentraciones de eritrocitos se reducen seguidas de una recuperación que solo se conserva pocos días después de almacenarla (FDA, 1993). No se ha reportado efectos clínicos significativos en el pH eritrocitario, consumo de glucosa,

niveles de ATP y 2,3 DPG, sin embargo en los niveles de hemoglobina libre en el sobrenadante se han observado incrementos (*Chapman et al., 1996*).

Las plaquetas. En la irradiación gamma en dosis de 50Gy no se han observado cambios clínicos significativos en las funciones de las plaquetas. Se ha demostrado que las plaquetas irradiadas dentro de 5 días de almacenamiento conservan la vida media normal de almacenamiento (*Chapman et al., 1996*).

Granulocitos. La evidencia de daño en las funciones de granulocitos debidos a la radiación gamma es confusa, pero en todo caso se recomienda que la transfusión se efectúe lo más rápido posible después de la irradiación.

Otro importante indicador de la calidad de la sangre irradiada es el potasio celular. Estudios previos demuestran que al irradiar eritrocitos los niveles de potasio extracelular aumentan al doble en comparación con un control sin irradiar (*Duguid et al., 1992*). Los aumentos en el volumen de potasio repercuten directamente en la vida de anaquel del producto irradiado.

2.4 Vida de Anaquel de la Sangre

La sangre total puede ser almacenada refrigerada entre 21 y 35 días dependiendo de la solución conservante-anticoagulante utilizada. Durante la conservación a 4°C las plaquetas y leucocitos dejan de ser funcionales al cabo de pocas horas después de la extracción, y se produce una reducción gradual de la viabilidad de los eritrocitos.

Durante el almacenamiento la integridad de las células sanguíneas depende de un delicado equilibrio bioquímico de muchos materiales, especialmente la glucosa, los iones hidrógeno (pH), y el trifosfato de adenosina (ATP). Este equilibrio se mantiene mejor en los eritrocitos cuando se almacenan a una temperatura entre 1 y 6 °C, en tanto que las plaquetas y leucocitos mantienen mejor su función almacenados a temperatura ambiente.

Por otro lado, se ha encontrado que el incremento en las concentraciones de potasio en sangre irradiada juega un rol muy importante en el proceso de deterioro celular y está directamente ligado a la reducción de vida de anaquel de este producto. Dinning y colaboradores reportaron que en sangre irradiada a 15Gy usando un irradiador Gammacell

(Vinten) las concentraciones de este ión se triplican a los 4 días de almacenaje a temperatura de 2-4°C, y explican que este aumento predispondría al daño cromosómico y así la muerte celular (*Dinning et al, 1991*). Para entender mejor este proceso, analizaremos el mecanismo celular donde interviene el ión potasio (K^+).

2.4.1 Potasio Celular

El potasio es el catión más abundante en el líquido intracelular del organismo humano. Está involucrado en el mantenimiento del equilibrio normal del agua, el equilibrio osmótico entre las células y el fluido intersticial y el equilibrio ácido-base, determinado por el pH del organismo (*Campbell, Neil 1987*). Dicha homeostasis se mantiene gracias a la actividad de la llamada bomba de sodio y potasio (Na^+ y K^+) que transporta activamente estos iones en contra de su gradiente de concentración y a veces en contra también de su gradiente de potencial.

La bomba de sodio y potasio controla el volumen celular al regular el flujo de éstos iones. El gradiente generado produce un potencial eléctrico que aprovechan todas aquellas sustancias que debe atravesar la membrana plasmática en contra del gradiente de concentración (fig. 4). A medida que sale sodio de la célula, el líquido extracelular adquiere un mayor potencial eléctrico positivo, lo que provoca atracción de iones negativos (cloro, bicarbonato) intracelulares. Al haber más iones de sodio y cloruros (Na^+ y Cl^-) en el medio extracelular, el agua tiende a salir de la célula por efecto de la ósmosis (*Alberts et al, 1998*). Estos cambios se producen en la célula como consecuencias de la acción de la radiación ionizante de manera directa o indirecta con respecto al núcleo celular (fig. 5).

2.5 Efectos Celulares Radioinducidos

El núcleo celular es la estructura sensitiva de la célula. En él se almacena la información genética dentro de la molécula de ADN. De ningún modo quiere decir esto que fuera del núcleo no haya otras estructuras celulares sensibles a los efectos radioinducidos. Tal el caso de los organelos vinculadas con el metabolismo aerobio, así como el sistema de endomembranas y la membrana celular.

Cuando la radiación ionizante causa excitación o ionización en un sistema biológico, en particular en el nivel de molécula crítica (ADN), las modificaciones ocurridas en esta molécula se deben a la acción directa de la energía entregada (efecto directo).

El efecto indirecto supone la interacción con una molécula adyacente (agua en la mayoría de los casos) que, al ionizarse, producirá un efecto de radiolisis generando moléculas intermediarias con gran reactividad química (radicales libres), además el oxígeno molecular disuelto en el agua puede reaccionar con los radicales hidrógeno para formar radicales hidroperóxido, o con los electrones libres para formar aniones superóxido. Dichos radicales libres reaccionan con el material genético próximo provocando, al igual que el efecto directo, algún tipo de lesión según el componente del ADN alcanzado, tales como:

Ruptura de cadenas. Las rupturas pueden ser simples o dobles. Las simples pueden sobrevenir a nivel de la unión fosfodiéster entre el fosfato y la desoxirribosa con más frecuencia, aunque también sobre la ligadura base-desoxirribosa. Una ruptura doble es la pérdida de continuidad de dos cadenas de ADN, a niveles distantes a menos de tres bases nucleotídicas promedio.

Alteración de bases. Las bases pueden ser destruidas o parcialmente modificadas, sufren sobre todo hidroxilación (por radical hidroxilo OH^\cdot) con formación de hidroperóxidos.

Alteración de los azúcares. Los azúcares son oxidados y luego hidrolizados con liberación de la base.

Otras lesiones. Pueden formarse distintos tipos de puentes entre las cadenas (cross links) o formación de dímeros.

Existen en la célula mecanismos de reparación del daño radioinducido. La complejidad de estos mecanismos nos obligará sólo a enumerarlos, recordando que implican la participación de numerosas enzimas. Los mecanismos son:

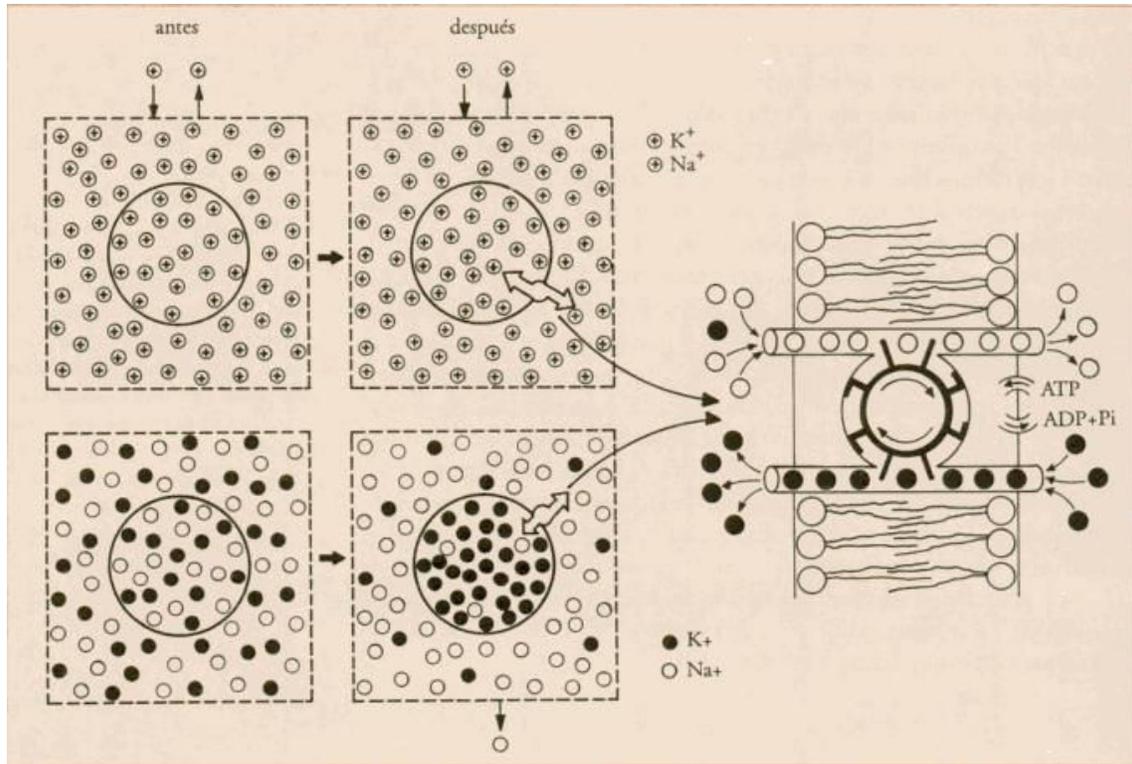


Figura 4. Bomba de Sodio Potasio. Esquema tridimensional idealizado de un fragmento de membrana con su bicapa de fosfolípidos y proteínas integrales que van de lado a lado y forman canales por los que fluye potasio iónico (círculos claros con signos +). Las cargas negativa (círculos negros) están fijas a proteínas que se esquematizan como ovillo. Las proteínas y sus cargas no pueden fluir a través de la membrana pero ejercen atracción sobre los iones de potasio que tienden a escapar de las células siguiendo su gradiente de concentración (esquema de la derecha). Las dos fuerzas (gradiente de concentración y eléctrico), que se simbolizan con flechas en sentidos opuestos, se oponen y cancelan entre sí.

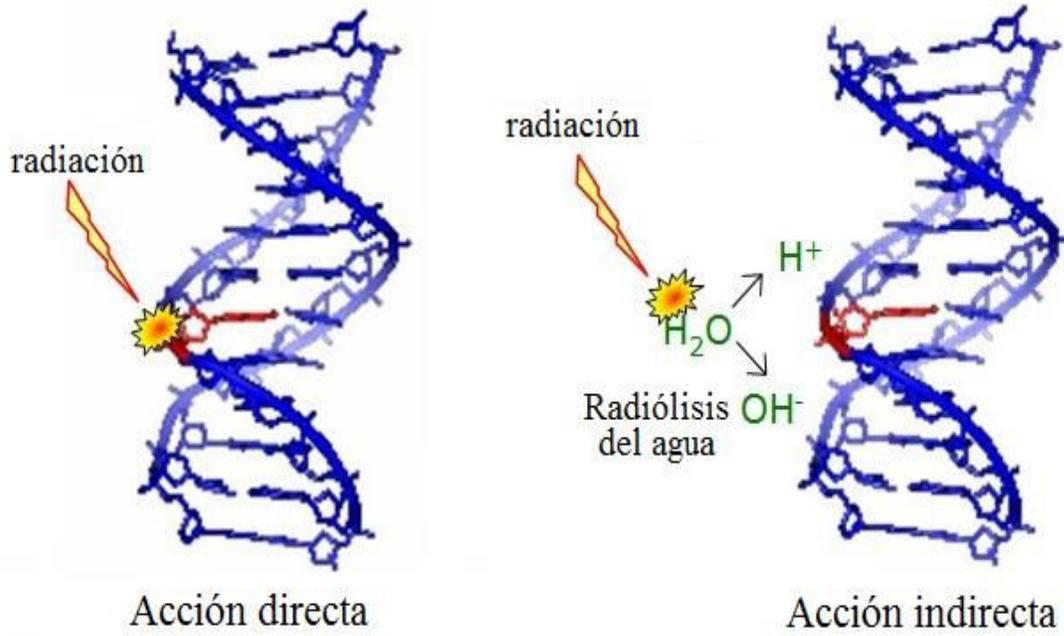


Figura 5. Mecanismo de acción directa e indirecta.

- Escisión y Resíntesis: mecanismo principal en moléculas de ADN que no están en fase de replicación. La lesión es reconocida y escindida. El nuevo fragmento es resintetizado tomando como modelo la cadena complementaria con participación de enzimas reparadoras (endonucleasa, ADN polimerasa y ligasa).
- Reparación postreplicativa: se observa en células en vías de replicación (fase S). Se ha evidenciado en células procariotes pero no aún en eucariotes.
- Reparación SOS: (no ha sido demostrada su presencia en células eucariotas).
- Tranquilación: hay enzimas que convierten los grupos alquilos en alcoholes.
- Fotorestauración: demostrada también en eucariotes, se trata de enzimas fotosensibles que transforman los dímeros de pirimidina en monómeros.
- Mecanismos reparadores de rupturas dobles: la reparación de rupturas simples es eficaz y rápida en células de mamífero, y se efectúa por escisión resíntesis. Las rupturas dobles pueden ser reparadas en bacterias, levaduras y células eucariotes. Es admisible un mecanismo de reparación por recombinación con la molécula homóloga de ADN, pero no ha sido aún del todo demostrado.

Después del daño nuclear, el daño directo de las membranas celulares (tanto de la plasmática como de los orgánulos) es la segunda vía en importancia de lesión celular. De hecho, independientemente de sus causas las células lesionadas muestran alteraciones funcionales y morfológicas similares.

2.5.1. Mecanismo de Destrucción Morfológico Celular

La generación de radicales libres es quizás el mecanismo más común de daño celular y trae como consecuencia cambios morfológicos y funcionales sobre la célula.

Membrana celular. La desagregación y degranulación del retículo endoplásmico rugoso (RER), causada presumiblemente por la peroxidación lipídica, puede interferir directamente con la interacción de los ribosomas y el RNAm. La radiación provoca dichos cambios,

seguidos de la actuación del Ca sobre las mitocondrias y exacerbación de los efectos sobre la célula. A consecuencia se produce una reducción en la síntesis de proteínas, específicamente de la apolipoproteína, sintetizada en los hepatocitos. Esta proteína utilizada en la síntesis en la exportación de los triglicéridos conduce a un acúmulo de lípidos en el interior del hepatocito, conduciendo a una lipidosis. De hecho, el acúmulo de lípidos es una de las causas comunes de muchas formas de daño celular.

En orden cronológico de los eventos desencadenados en la célula, podemos citar:

- 0-15 minutos: primeros cambios en las mitocondrias.
- 15-30 minutos: distorsión de la membrana plasmática, continua la condensación de la matriz mitocondrial, aparente dilatación del retículo endoplásmico.
- 30-1 hora: degranulación de los polirribosomas del RER, distensión del compartimento interno mitocondrial, depósitos amorfos densos.
- 2-4 horas: tumefacción mitocondrial exagerada gran incremento de volumen, tumefacción del RER y fragmentación, rotura de la membrana plasmática, condensación de la cromatina y manifiesta cariólisis.
- Mayor a 4 horas: fragmentación de todas las organelas, figuras de mielina de la membrana, rotura de lisosomas al citosol e inicio de la autólisis.

Los cambios en la estructura mitocondrial y en sus funciones son los primeros indicadores de la lesión celular hipóxica.

Inicialmente la mitocondria sufre una condensación de la matriz, y a continuación una tumefacción mitocondrial, con disminución de la altura de las crestas mitocondriales. Hasta este momento la lesión celular es de tipo reversible. Si progresa la tumefacción, los gránulos de la matriz desaparecen y esta conserva una apariencia aclarada. Se forman unas condensaciones densas de depósitos amorfos correspondientes a lipoproteínas y proteínas desnaturalizadas. Asimismo, la entrada del ión Ca^{++} provoca depósitos de sales insolubles. Se forman megamitocondrias, mitocondrias de menor tamaño (fig. 6).

La membrana plasmática. Es también uno de los primeros orgánulos que sufre los cambios hipóxicos celulares. Se manifiesta morfológicamente por hinchamiento y pérdida de las estructuras especializadas.

Estas distorsiones se acompañan de cambios en el citoesqueleto, ya que son especialmente sensibles a las concentraciones de iones y especialmente al calcio.

Sus funciones:

- mantenimiento de la concentración de iones y agua conservando el volumen celular y la permeabilidad celular.
- receptora de estímulos.
- protección física.
- **Retículo endoplásmico rugoso (RER).** En los primeros estadios sufre una dilatación y fragmentación. Producida por el acúmulo de agua e iones de sodio en su interior, al atravesar la membrana hacia la luz cisternal, a continuación se produce una degranulación y desagregación de los polirribosomas. Más tarde aparecen consecuencias sobre las proteínas ribosomiales y los ácidos nucleicos.
- **Lisosomas.** Contienen potentes enzimas hidrolíticas capaces de digerir todos los componentes del citoplasma. La evacuación enzimática provoca con toda seguridad la muerte celular y por supuesto supone una exacerbación de la lesión.

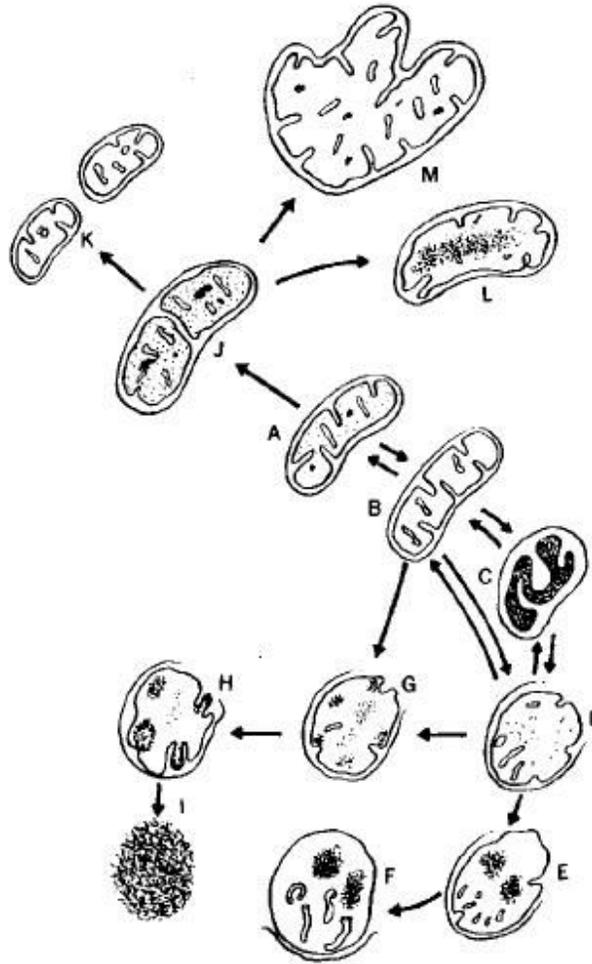


Figura 6. Cambios morfológicos mitocondriales

Sin ninguna duda la tumefacción lisosomal es el primer cambio debido al flujo de iones yagua antes de que la lesión celular sea irreversible. La evacuación de los enzimas al citosol celular antes de que se vuelva irreversible la lesión es difícil demostrar. Esto contrasta con lo que ocurre con los neutrófilos y macrófagos, en los que se secretan en la célula viva.

Núcleo. Entre los cambios radioinducidos en el núcleo se describen los siguientes:

- Alteraciones del tamaño (anisocariosis)
- Alteraciones de la forma (anisomorfia)
- Alteraciones de la localización
- Marginación del núcleo
- Centralización del núcleo
- Alteraciones del número (células multinucleadas)
- Alteraciones de la división (anisodiéresis)
- Alteraciones de la estructura
- Alteraciones de la cromatina
- Hiper Cromatosis parietonuclear
- Pcnosis (retracción del núcleo con condensación de la cromatina).
- Cromatorrexis/cromatolisis (degeneración y desaparición de la cromatina nuclear); cariorrexis/cariolisis (destrucción del núcleo)
- Alteraciones de los cromosomas
- Alteraciones del nucleolo
- Marginación nucleolar
- Segregación nucleolar

- Alteraciones de la membrana nuclear

Mitocondrias. Entre las lesiones provocadas en las mitocondrias se encuentra:

- Alteraciones del tamaño
- Mitocondrias tumefactas o degeneradas
- Megamitocondrias
- Mitocondrias de menor tamaño
- Alteraciones del numero
- Aumento/disminución
- Alteraciones en la localización:
- Presencia de inclusiones en la Matriz.

Alteraciones del RER (retículo endoplásmico rugoso) y ribosomas

- Aumento/disminucion de RER y ribosomas.
- Degranulacion del RER.
- Condensacion y acumulación de proteínas en el interior de cisternas.
- Fragmentación o rotura de cisternas de RER.

Alteraciones del retículo endoplásmico liso (REL)

- Aumento del número de cisternas.
- Dilatación y vesiculacion difusa de cisterna.
- Fragmentación o rotura de cisternas.

- Inactivación de enzimas detoxicantes.

La radiación ionizante inactiva a las células alterando algunas de las estructuras críticas para su supervivencia; la mayoría de las veces el material genético, como se ha comentado anteriormente. El daño a la doble hélice afecta a la expresión de algunos genes y a la biosíntesis de varias enzimas que interfieren con la división celular, tanto en células procariotas como eucariotas; por ello, la irradiación es tan útil para impedir la proliferación de algunas células, especialmente los linfocitos debido a su alta radiosensibilidad y el rol que juegan en la respuesta inmunitaria.

Por lo tanto, en nuestro estudio evaluamos a mayor detalle el mecanismo intrínseco de destrucción celular en leucocitos (de muestras de sangre periférica irradiadas con ^{60}Co a dosis de 25 y 50Gy) con respecto a los cambios moleculares y morfológicos debidos a los aumentos del potasio celular.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se realizó un estudio experimental en muestras de sangre periférica de individuos del sexo masculino aparentemente sanos de Hermosillo, Sonora, México. Se empleo el muestreo incidental para elegir sujetos mayores de 18 años que no hubieran estado expuestos a fuentes radiactivas (en los últimos 6 meses para medicina diagnóstica; en los últimos 2 años en caso de radioterapia; y en ninguna ocasión por exposición accidental). Se excluyeron los sujetos que durante la toma de muestra cursaban alguna patología o condición que altera los valores normales de la CH; y aquellos que se presentaron a la toma de muestra sin ayuno y/o con ingestión de bebidas alcohólicas en las últimas 8 horas. Una vez incluidos en el estudio, y solicitada su autorización por escrito en el consentimiento informado. Fueron eliminados del estudio aquellos sujetos cuyo volumen de muestra fuera insuficiente para realizar adecuadamente las pruebas.

Las técnicas utilizadas fueron las siguientes:

3.1 Obtención de la Muestra

La toma de muestra se realizó por la mañana en ayunas y cumpliendo los requisitos para la extracción de sangre desde una vena periférica, procedimiento también conocido como flebotomía. La muestra de sangre (aproximadamente 8 mL) fue extraída a los sujetos en tubos Vacutainer de tapón lila anticoagulado con EDTA para realizar los análisis de CH; y alrededor de 5 mL en un tubo Vacutainer rojo para separar las muestras de suero sanguíneo. Una vez etiquetados los tubos, y separando un control, se irradiaron las muestras.

3.2 Método para Irradiación de la Sangre

Inicialmente se calculó el tiempo de exposición que las muestras de sangre requerían en el GC-E220 para alcanzar dosis deseadas (tabla I). Esta cifra (tiempo) fue ingresada manualmente en la cámara de operación y una vez colocadas las muestras en la cámara de muestras se inició el proceso. Después de la irradiación se practicó un extendido sanguíneo con una gota obtenida de las muestras irradiadas y control. Dicho frotis fue teñido usando el colorante Giemsa.

3.3 Tinción de Giemsa

El extendido sanguíneo se fijó con metanol al 95% de 3 a 5 minutos antes de iniciar la tinción. Se colocó colorante Giemsa sobre el portaobjetos hasta cubrir la superficie del frotis dejando actuar por 15 minutos. Se realizó un lavado del portaobjetos con flujo suave de agua corriente y se dejó secar al aire. Finalmente los frotis fueron observados al microscopio óptico sobre el objetivo de 100x, con la opinión de expertos en el área.

3.4 Citometría Hemática

La citometría hemática (CH) es un estudio de laboratorio destinado a informar sobre el número y las características de las células sanguíneas (*Ruiz-Argüelles, 2001*). La interpretación correcta de toda la información que ofrece una CH permite establecer sospechas diagnósticas definidas sobre la enfermedad que causa las alteraciones de la

misma. La interpretación de la CH supone el análisis detallado de cada uno de los parámetros que informa, los cuales pueden dividirse en tres grandes grupos: datos de la serie roja, de la serie blanca y de la serie trombocítica.

El análisis de CH se realizó en el LACIUS utilizando el BK Coulter Act Diff. Inicialmente los tubos Vacutainer de tapa lila se colocaron en agitación lenta. Después se colocó el capilar del Coulter, a cada tubo individualmente, el cual aspiró una pequeña porción de la muestra.

3.5 Reacción Tetrafenilborato de Sodio

El tetrafenilborato sódico reacciona con los iones de potasio en un medio alcalino libre de proteínas para producir una suspensión turbida de tetrafenilborato de Sodio. La cantidad de turbidez producida es proporcional a la concentración de potasio (*Hillman y Beyer, 1967*). El método utilizado para la determinación de potasio se basó en la técnica turbidimétrica publicada por Hillman y Beyer en 1967, siendo modificada a través del uso de TCA como reactivo precipitante.

El procedimiento inicia con la preparación del sobrenadante libre de proteínas. Para ello se añadieron 0.05 mL de suero a tubos previamente etiquetados. Enseguida se agregaron 0.5 mL de Reactivo TCA precipitante gota a gota a cada tubo mezclado vigorosamente. Se dejó en reposo por 5 minutos, después se centrifugó a alta velocidad durante 5 a 10 minutos. El patrón de trabajo viene preparado por Randox.

El patrón y el sobrenadante claro se añadieron en el medio de la superficie del reactivo de trabajo, se produjo una turbidez homogénea. Se mezcló cuidadosamente y se dejó reposar 5 minutos. Finalmente se midió la absorbancia del patrón y la muestra frente al reactivo blanco. De acuerdo a estas determinaciones se calculó la concentración de potasio siguiendo la siguiente fórmula: Absorbancia de la muestra entre absorbancia del patrón multiplicado por 5 es igual mmol/L de Potasio. Se utilizó el medidor automatizado Vitalab Selectra.

Tabla I. Dosis suministradas.

Dosis (Gy)	Tiempo necesario (s) en el GC-220E
10	1.9
15	4.7
20	7.4
25	10.2
30	12.9
35	15.7
40	18.4
45	21.2
50	23.9

3.5 Técnica de Inmunohistoquímica (ABP)

Expresión de marcadores moleculares en linfocitos (apéndice 7.3). Se utilizó el método inmunohistoquímico ABP a las muestras irradiadas y control. Para valorar la inmunorreactividad de la proteína p53 se consideró un grupo positivo de tejido de mama; mientras que para el linfocito T se usó como autotestigo tejido de ganglio CD3+, y tejido de amígdala CD20+ para el linfocito B.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En nuestro estudio, las pautas para proponer el diseño de un protocolo de irradiación de sangre se basaron en dos puntos fundamentales: primero la estandarización del método de irradiación descrita en los aspectos técnicos del procedimiento, y la segunda enfocada en la evidencia clínica (bioquímica y molecular de linfocitos) local de irradiar la sangre con el GC-E220 ubicado en el Centro blindado del Laboratorio de Física de Radiaciones de la Universidad de Sonora.

4.1 Aspectos Técnicos del Procedimiento

Como punto de partida en la propuesta de nuestro protocolo de irradiación de sangre humana hemos ajustado por medio de cálculos lógico-matemáticos dependientes de la ley de decaimiento exponencial el método más adecuado para calcular tiempo de dosis para el GC-220E, considerando las características particulares de esta fuente.

En la tabla II podemos observar los datos sobresalientes acerca de las características físicas de la fuente de Cobalto-60 del GC-220E, tales como:

Fecha inicial. La fecha inicial corresponde al día exacto en que fue fabricada la porción de ^{60}Co entregada al Laboratorio de Física de Radiaciones para su posterior incorporación en la cámara de muestra del GC-220E. Esta fuente contenía una actividad de dosis determinada y certificada por el fabricante a partir de esa fecha.

Tasa de dosis inicial. Este valor representa la concentración de la fuente (actividad inicial) determinada en función del tiempo transcurrido desde el depósito inicial.

Lambda (λ). Es la constante de desintegración radiactiva, es la probabilidad de desintegración por unidad de tiempo.

Dosis de transito. Representa la dosis que adquiere la muestra en su recorrido desde la parte superior de la cámara de muestra hasta llegar a la cámara central de irradiación donde se suministra la dosis pre-establecida.

Para facilitar el proceso de cálculo de dosis o tiempo requerido, días transcurridos y decaimiento de la actividad de la fuente con respecto a su dosis inicial, se estableció una

Tabla II. Características de Fabrica de la Fuente de ^{60}Co del GC-220E.

Característica	Detalle
Fecha inicial	05 de Octubre de 2004
Actividad inicial	14268
Tasa de Dosis	11,6100 KGy/h 11,610 Gy/h 193.5 Gy/min 3.225Gy/s
Lambda (λ) (1/día)	3.60E-04
Dosis de tránsito	6.21 Gy

tabla automatizada en hoja de Excel que nos permite calcular una incógnita, ya sea el tiempo en segundos o la dosis deseado de exposición a la radiación con nuestra fuente, colocando en una de las celdas el valor deseado.

En la figura podemos observar un ejemplo de cálculo de dosis. Suponiendo que nuestra dosis deseada es de 25Gy. En el recuadro morado (dosis real recibida en Gy), colocamos la dosis deseada. En este caso fueron 25Gy y para corregir de antemano el aumento de dosis de 6.21Gy debidos al proceso de transito de la muestra, a éstos 25Gy deseados le restamos la dosis de tránsito 6.21, dando como resultado la dosis resaltada en color rosa (18.97Gy), es decir la dosis sin la corrección de tránsito. Entonces, de acuerdo a la hoja de Excel se requieren 10.88 segundos (área azul), para alcanzar 18.97Gy, que si sumamos los 6.21Gy de dosis recibida en el transito la dosis real que recibirá nuestra muestra equivale a 25Gy.

Finalmente, podemos resumir el proceso manual de irradiación en los siguientes puntos

1. Calcular el tiempo necesario para alcanzar la dosis deseada corregida de irradiación considerando el tiempo de transito usando la hoja de cálculo pre-establecida en Excel.
2. Etiquetar adecuadamente las muestras (uso de etiquetas *radtag* para que sea identificada como tejido irradiado) y preparar previamente el contenedor de la muestra (asimétrico de preferencia), en caso de irradiar en un contenedor distinto a las bolsas de sangre.
3. Colocar la muestra (bolsa de sangre o contenedor) en la cámara de muestras e ingresar la cifra exacta en segundos calculada por el programa en el Excel del paso 1. Nota: Cabe señalar que este procedimiento será realizado por el técnico y/o encargado del equipo POE certificado; esto

	A	B	C	D	E	F	G
1	FUENTE DE COBALTO-60 DEL GC-220E						
2	Fechas (Gammacell 220 Excell)		Dosis (KGy/hr)	Dosis (Gy/hr)	Dosis (Gy/min)	Dosis (Gy/s)	
3	Inicial	05/10/2004	11.61	11610.00	193.50	3.23	
4	Hoy	07/07/2009	6.21	6214.82	103.58	1.73	
5	Días transcurridos	1736					
6	Lambda (1/Días)	3.60E-04					
7	Dosis Requerida sin corrección (Gy) :	18.79	Tiempo requerido	0.00302342	0.18	10.88	
8	Dosis de tránsito (Gy):	6.21					
9	Dosis real recibida (Gy):	25.00					
10	Corrección de Tránsito						
11	Dosis [Requerida - Tránsito] (Gy)	12.58		0.00202342	0.12		
12	Dosis recibida corregida por tránsito (Gy)	18.79				7.28	
13	Actividad Inicial	14268.00					
14	Actividad Actual	7637.64					
15							

Figura 7. Ejemplo de cálculo de tiempo-dosis.

nos asegura la máxima protección (uso de dosímetro personal) tanto para el manipulador de la muestra como para el uso del equipo.

4. Retirarse del irradiador y esperar a que el proceso termine, (unos segundos o minutos dependiendo de la dosis suministrada). El GC-220E nos indicará por medio de una alarma que el proceso ha finalizado.
5. Retirar la muestra de la cámara de muestras y almacenar a 4°C.

A partir del momento que la sangre irradiada se almacena para su conservación se procede a realizar las pruebas de investigación deseadas, y/o es proporcionada al servicio médico para su uso terapéutico.

4.2 Efectos en la Estabilidad y la Calidad de la Sangre Irradiada

Para enfocarnos en los efectos celulares de estabilidad de calidad y estabilidad de la sangre irradiada para uso terapéutico consideramos, dado el hecho de que para prevenir la EICH-PT se persigue la eliminación de la capacidad mitótica de los linfocitos, el monitoreo de los efectos radioinducidos en las células linfocitarias especialmente.

4.2.1 Estabilidad Cuantitativa en linfocitos de Sangre Irradiada

Para analizar la estabilidad cuantitativa de los linfocitos al almacén, se monitorearon las concentraciones de dichas células en las muestras de sangre irradiada y control durante los primeros tres días. Las concentraciones de linfocitos en las muestras sin control (sin irradiar y sin tiempo de almacén) se encontraron dentro de los rangos de referencia, 20.5-51.1%, considerados en el equipo utilizado (*Manual Beckman Coulter, 1990*). Este fenómeno se observó incluso para las diez dosis suministradas, solo mostrando ligeras variaciones dentro del rango señalado.

En la figura 8 se observan las diferentes variaciones en el porcentaje de linfocitos presentes en sangre periférica dentro del rango considerado normal o de referencia (área punteada), y éstas se mantienen incluso después de irradiarse a altas dosis (50Gy). Las concentraciones en el sujeto A oscilan entre 27.1 y 26.6% manteniéndose como el caso que más se acerca al

límite inferior de referencia; contrario a lo que se observó en el sujeto B cuyos porcentajes entre 42.6 y 42.8 representan el más cercano al límite superior. Por su parte los determinaciones en los sujetos C, D y E se mantienen como el rango ideal o promedio, sin embargo las concentraciones linfocitarias el sujeto C (que después de le flebotomía mostro debilidad y mareo) mostraron variaciones inestables en las diferentes dosis dentro de estos rangos (31.5-36.4%).

El comportamiento promedio del grupo control (sin irradiar a tiempo 0) se mantuvo oscilando alrededor del 36%. Las líneas punteadas con rojo representan los límites superiores e inferiores considerados como los valor estándar de referencia, 51.1 y 20.5% respectivamente (fig. 9).

En el mismo sentido, para evaluar el comportamiento general, se determinó por medio de la CH el comportamiento promedio de la concentración linfocitaria en los sujetos de estudio a dosis de 0, 10, 15, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 Gy y después de su almacén de tres días a 4°C.

Con este análisis encontramos una tendencia creciente de células linfocitarias detectadas por el Coulter dosis-dependiente e independiente del tiempo de almacén (fig. 10), en contraste con los resultados reportados por otros autores que reportan el decaimiento linfocitario utilizando otros métodos de conteo como el ADVIA-120 previa separación magnética de linfocitos (Dynabeads M-450 CD14 Beads) (Grace et al., 2006).

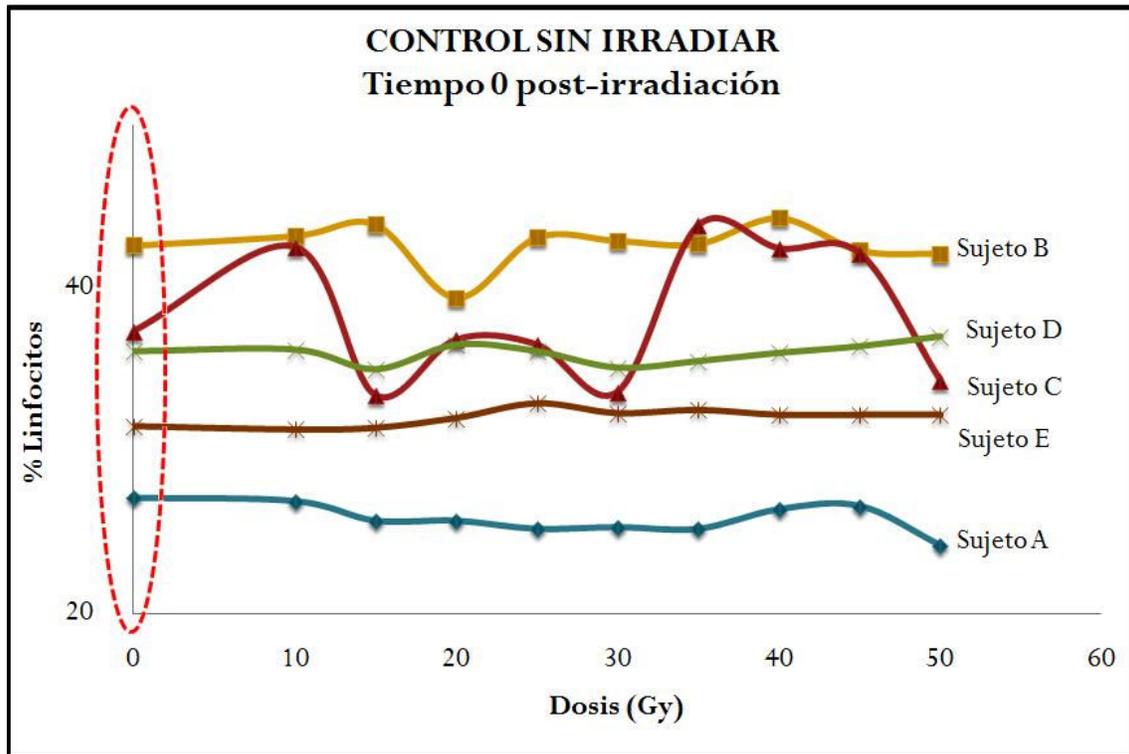


Figura 8. Conteo relativo de linfocitos en sangre periférica.

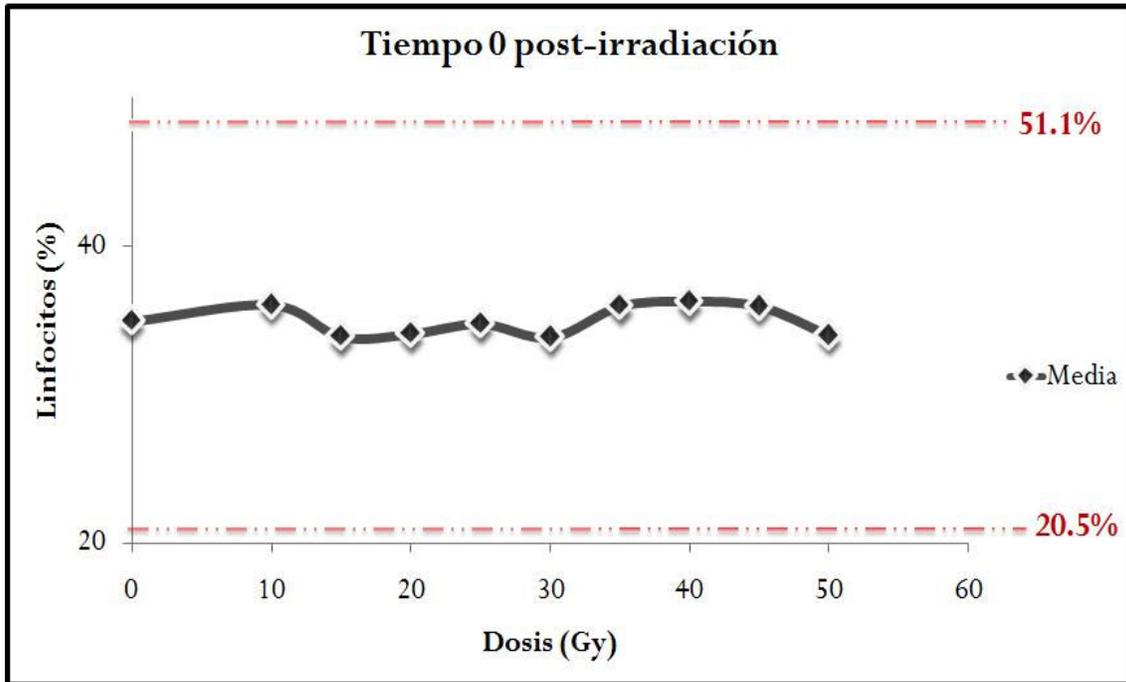


Figura 9. Conteo relativo de linfocitos en población promedio.

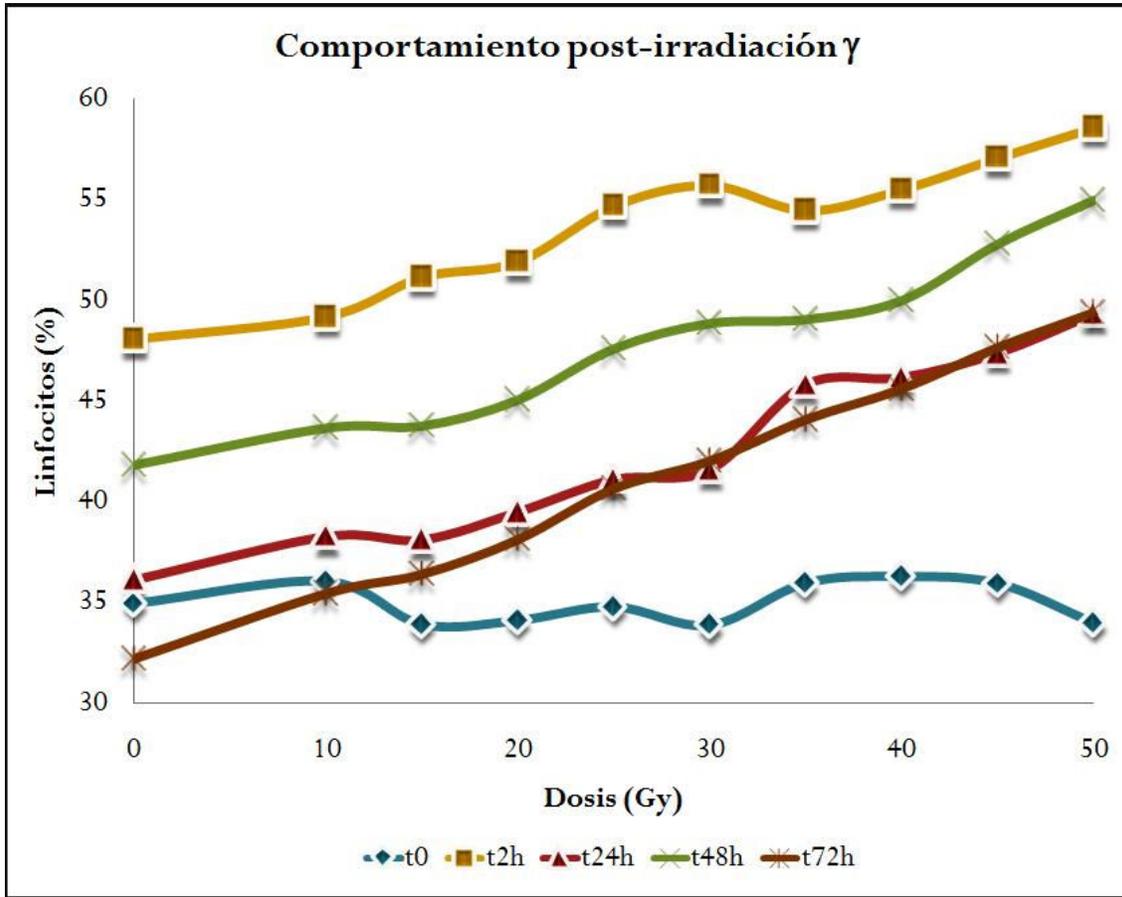


Figura 10. Comportamiento promedio de la concentración linfocitaria en tres días de almacén a 4°C.

Sin embargo, el equipo utilizado en este trabajo, el Beckman Coulter Cell Analyzer, basa su detección en relación a la impedancia eléctrica que produce cada célula al atravesar una corriente de cierto voltaje, es importante señalar que en esta detección no se distingue entre células vivas y muertas; por ello en nuestro estudio esperábamos encontrar decremento en el conteo linfocitario debido a la respuesta celular temprana post-irradiación basada en el Coulter (*Santacruz et al., 2007*), pero no así después de su almacén. Estos valores inesperados nos sugieren que el equipo confundió a otras células sanguíneas, como los monocitos cuyos efectos morfológicos debidos a la radiación (aumento del volumen celular) le otorga una bioimpedancia muy parecido al de los linfocitos.

Por lo tanto, sistemas de conteo celular como el Coulter son útiles para diferenciar grandes cambios en conductividad, que para medir cambios estructurales en un solo grupo de tejidos (*Othman et al., 2001*).

Uno de los puntos importantes a conocer gracias a estos resultados es que los linfocitos inactivados por la radiación, presentan características electroquímicas diferentes del resto de las células vivas, en especial una impedancia muy alta.

Estos resultados asombrosos nos sugieren en un futuro enfocar una parte importante de nuestro estudio a técnicas que pongan en evidencia la viabilidad celular tras el proceso radioinductivo de transformación morfológica. Del mismo modo, estudiar a mayor detalle el rol de las propiedades electroquímicas de las células transformadas por la radiación utilizando medidores especiales para bioimpedancia tales como la medida en puente, la medida de I-V, el puente autobalance o la reflectometría (*impedance measurement handbook, 2006*).

De manera adicional, con el análisis morfológico y molecular realizado en este estudio pretendemos complementar a mayor detalle las variaciones en el conteo celular determinado por el Coulter.

4.2.2 Estabilidad Morfológica en Linfocitos

Los mecanismos de destrucción morfológica leucocitaria (*Santacruz-Gómez et al, 2008*) fueron estudiados considerando dos posibles factores causantes de estrés celular radioinducido: a) el incremento en la concentración de potasio celular y b) la señalización molecular de lesión y muerte celular.

El análisis morfológico mostró evidencia de tres mecanismos biológicos inducidos por la irradiación γ . Dentro de los cuales, cada uno presentó sus evoluciones, su población blanco y su aparición características. El primer fenómeno, caracterizado por presentar inestabilidad nuclear y citoplasmática a dosis de 3.21 a 10.29Gy. La más leve manifestación de este mecanismo fué la condensación del núcleo dándole la apariencia de hendido a 3.21Gy. Esta irregularidad se clasifica como subtipo 1 (*De acuerdo al Laboratorio Nacional de Referencia de Hematología, 2005*). A dosis de 5.57 a 7.93Gy el efecto evolucionó a anomalías en la estructura del citoplasma y condensación del núcleo. Estas características morfológicas coinciden con la descripción de una célula en fase de muerte programada, tales como: condensación de la cromatina nuclear, disminución y/o desintegración nuclear, alteraciones del citoesqueleto y aspecto de burbuja de la membrana (*Wyllie AH, 1984; Cohen J, 1993*). En nuestro estudio en la última etapa de este fenómeno se observó condensación del citoplasma y liberación de restos nucleares a los 10.29Gy (fig. 11, a).

El segundo mecanismo, la fragmentación celular, se caracterizó por el rompimiento nuclear y citoplasmático en linfocitos a dosis desde 12.65 a 24.45Gy. En este fenómeno las células afectadas mostraron mayor volumen celular (relacionado con el incremento de potasio), condensación de núcleo y consiguiente fragmentación, inicialmente del citoplasma y evolucionado después a núcleo (fig. 1, b). En etapas moderadas de este daño (aproximadamente de los 15 a los 20Gy), evidenciada la ruptura del núcleo en dos o más fragmentos, para finalmente a dosis cercanas a los 25 Gy, observar el núcleo plenamente seccionado y a su vez, en el exterior de la célula, desprendimiento de inclusiones nucleares como gránulos azurófilos o subtipo 4 (*LNRH, 2005*)

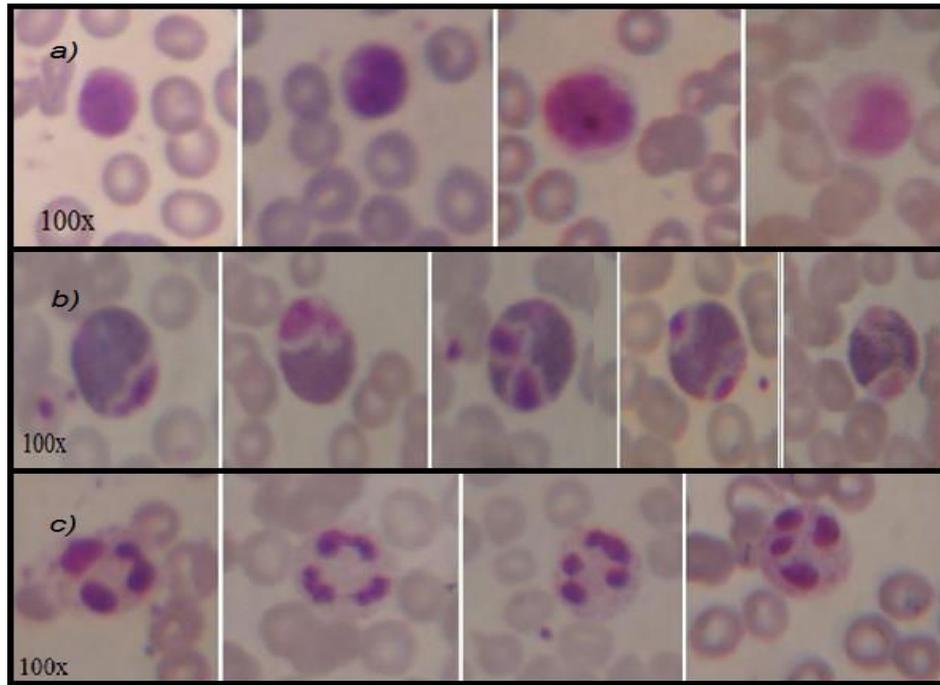


Figura 11. Mecanismos de destrucción morfológica radioinducida en leucocitos.

a) Inestabilidad estructural linfocitaria caracterizada por el aumento del volumen celular a dosis de 3.21 a 10.29Gy; b) fragmentación celular (nuclear y citoplasmática) a dosis desde 12.65 a 24.45Gy; y c) disociación lobular en neutrófilos a 50Gy.

Las dosis que abarcan este mecanismo son especialmente importantes para el estudio de la calidad de la sangre irradiada para fines terapéuticos en particular la culminante de esta etapa, es decir, los 25 Gy (*GGIBC, 2003*).

De los 25 a los 50Gy, se observaron pocos linfocitos los cuales mostraron etapas severas de los mecanismos descritos anteriormente. Sin embargo, a partir de los 52.77Gy se observó el tercer mecanismo morfológico inducido post-irradiación γ en leucocitos, clasificado en este trabajo como de disociación lobular en neutrófilos. En este caso los lóbulos del núcleo, que habitualmente se mantienen unidos por un filamento de cromatina, se observaron separados entre sí (fig. 1, c). Dichos hilos de cromatina están formados por ADN y proteínas, por lo cual es muy probable que el material genético haya sido afectado de manera directa al ADN y/o que las proteínas contenidas hubieran sido disociadas en el proceso de formación de radicales libres por acción indirecta de la radiación ionizante.

La presencia de los defectos morfológicos de destrucción celular incluidos en estos tres mecanismos varió con respecto a la dosis y el tiempo post-irradiación. Para el caso de la pérdida de la integridad celular, la frecuencia de estos defectos aumentó con respecto a la dosis (se triplicó a los 50Gy con respecto a los 25Gy). La frecuencia de los defectos característicos del segundo mecanismo descrito, se intensificó fuertemente a pocas horas de almacén hasta alcanzar su punto máximo 24 horas post-irradiación, seguido por un decremento casi total a las 48 horas siguientes. Finalmente, los defectos observados de disociación lobular en neutrófilos fueron poco frecuentes a los 25Gy sin mostrar grandes incrementos debidos al almacén, sin embargo a los 50Gy aumentó la frecuencia de este defecto morfológico hasta las 48 horas post-irradiación (fig. 12).

En el mecanismo de pérdida de la integridad celular se observó que no existe diferencia significativa entre la muestra control y la irradiada a 25Gy, sin embargo en las muestras irradiadas a 50Gy este fenómeno predomina incluso a partir de las 24 horas post-irradiación.

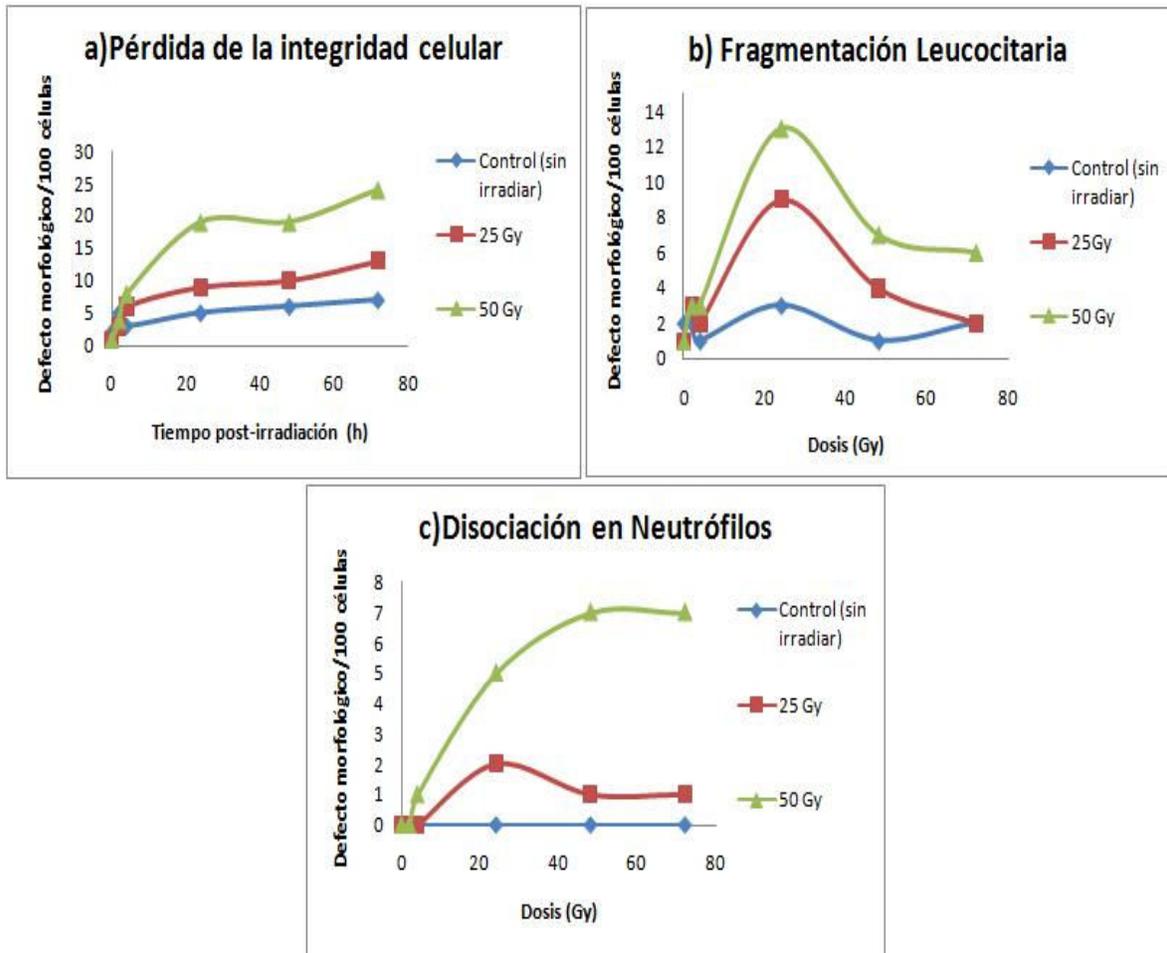


Figura 12. Frecuencia de defectos morfológicos en 100 células.

En el caso del mecanismo de fragmentación leucocitaria se encontró que tanto para la muestras irradiadas a 25 como 50Gy se alcanzaron niveles elevados de ocurrencia a las pocas horas post-irradiación, siendo a las 24 horas el punto máximo, seguido por un decaimiento a las 48 horas post-irradiación hasta alcanzar estabilidad a partir de las 72 horas post-irradiación. La aparición del efecto de disociación lobular en neutrófilos incremento al poco tiempo post-irradiación alcanzando su máxima expresión a las 24 horas post-irradiación para continuar disminuyendo a los 25Gy, sin embargo para los 50Gy este defecto aumento a las pocas horas post-irradiación alcanzando su punto máximo a las 48 horas post-irradiación.

Por su parte, para evaluar la gravedad de la lesión celular debida a estos mecanismos morfológicos radioinducidos, se estudio la expresión de la proteína p53 por medio de la técnica inmunohistoquímica ABP.

4.2.3 Estabilidad Molecular en Linfocitos: Evidencia de Apoptosis

En nuestros resultados, en las muestras irradiadas a 25Gy se observó disminuida la expresión del marcador de superficie CD3, por lo tanto la población de células T había disminuido notablemente con respecto a la muestra control. Por otro lado, las células B se expresaron moderadamente con respecto al control sin irradiar, pero mayoritariamente con respecto a las células T a la misma dosis. El gen p53, para esta dosis, se expresó fuertemente con una intensidad mayor al 30% (tabla III).

A los 50Gy no se observó la presencia del antígeno CD3, mientras que en los pocos linfocitos que permanecían a esas dosis se mostraba la expresión del CD20 en una intensidad de 10%, lo cual nos indicó que los linfocitos sobrevivientes a elevadas dosis son principalmente las células B. Finalmente el gen p53 se expresó fuertemente con una intensidad mayor al 60% (tabla III). Estos resultados coinciden con datos de otros estudios sobre lesión celular que demuestran que las células altamente radiosensibles

Tabla III. Expresión de marcadores en linfocitarios post-irradiación

Dosis (Gy)	Marcador utilizado	Intensidad (cruces)
0	CD3	+++
	CD20	+++
	P53	-
25	CD3	-
	CD20	+
	P53	++
50	CD3	-
	CD20	-
	P53	+++

Morfológicamente se visualizaron las diferentes etapas de destrucción de las células blancas por medio de la tinción Giemsa. A su vez, la IHQ nos permitió corroborar como genéticamente la célula se había programado para morir debido a la magnitud de la lesión irreversible ocasionada en el ADN de la célula por la radiación γ .

4.3 Calidad de la Sangre Irradiada

Del mismo modo, en nuestro estudio se demostró que las lesiones debidas a estos mecanismos morfológicos radioinducidos se encuentran estrechamente relacionadas con la pérdida de la homeostasis celular debida a los incremento de potasio intracelular. Cualitativamente esto se manifestó con el aumento progresivo en las concentraciones de potasio sérico (fig. 13), donde se observa que incluso en el control sin irradiar la concentración de potasio aumenta con respecto al tiempo de almacenaje. Sin embargo, en las muestras irradiadas a 25 y 50Gy estas concentraciones se duplican y cuadruplican respectivamente. En el recuadro que se muestra arriba de la figura se puede observar el cambio temprano (2 y 4 horas post-irradiación), donde se demuestra incrementos notables en ambas dosis.

En las primeras 4 horas de almacenaje las concentraciones de potasio aumentan de forma similar tanto para las muestras irradiadas a 25 y 50Gy como para el control sin irradiar. Sin embargo, a partir de las 24 horas post-irradiación, las concentraciones de potasio crecieron en más de 1 mmol/L en el caso de los 25Gy hasta alcanzar una concentración promedio de 8.57mmol/L. En las muestras irradiadas a 50Gy se observó un incremento temprano más acelerado de las concentraciones de potasio con respecto a la muestra irradiada a 25Gy y a la muestra control (tabla IV).

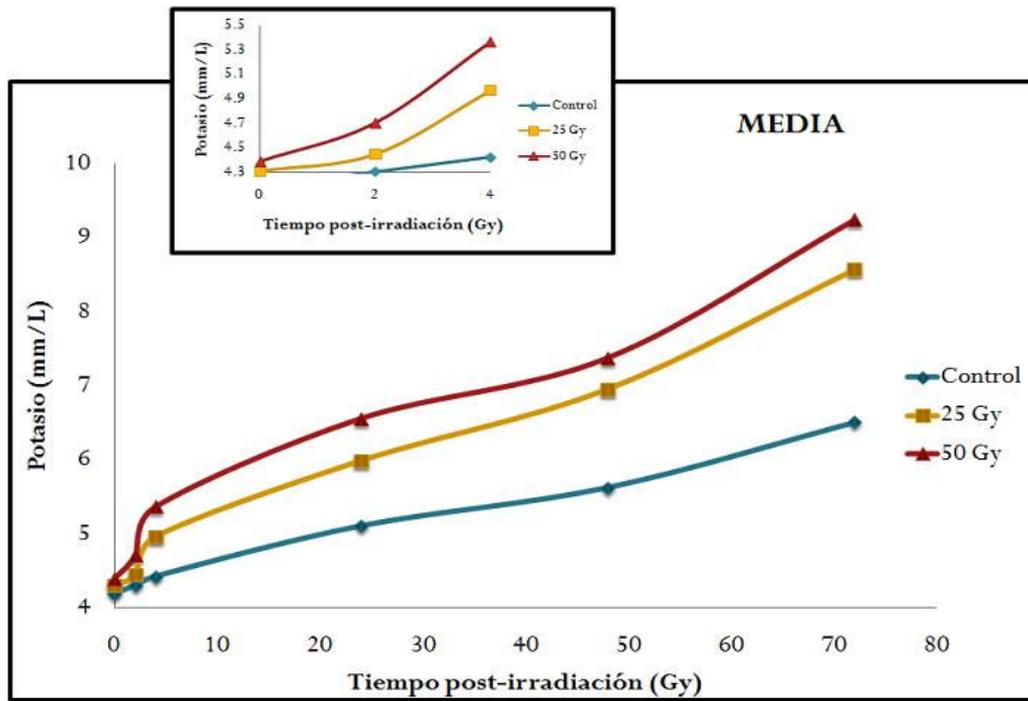


Figura 13. Determinación de Potasio sérico en muestras de sangre irradiada.

Tabla IV. Concentración de Potasio sérico en sangre irradiada a 72 horas de almacén a 4°C.

Tiempo post-irradiación γ (h)	Control sin irradiar	25Gy	50Gy
0	4.19±0.543	4.31±0.53	4.39±0.52
2	4.30±0.56	4.45±0.49	4.70±0.53
4	4.24±0.53	4.97±0.49	5.37±0.58
24	5.11±0.80	5.99±0.73	6.56±1.08
48	5.62±0.93	6.96±0.83	7.38±1.15
72	6.51±0.74	8.57±0.66	9.25±1.09

Valores promedios, \pm DE (desviación estándar). Rango de referencia: 3.6-5.5mmol/L

Estos incrementos de las concentraciones de potasio están relacionados con el aumento en la permeabilidad membranal y como consecuencia la fragmentación citoplasmática. Al ser la célula más permeable esta pierde el control tanto del flujo de los líquidos extracelulares al interior como del intercambio catiónico de la bomba sodio-potasio, provocando influjo pasivo de agua y un notable aumento de las concentraciones de algunos iones como el Cl^- , K^+ , Na^+ . El paso de potasio al interior de los leucocitos desde el plasma contribuye a que ocurran los mecanismos morfológicos descritos inicialmente.

La permeabilidad membranal para cada ión depende de que la membrana celular contenga los canales apropiados y de que éstos estén abiertos en la situación adecuada. Por otra parte, algunos canales iónicos son específicos, es decir, sólo permiten el paso de una especie iónica o una especie fluye a través de ellos con mayor facilidad que otras. Otros canales, sin embargo, permiten el paso de más de una especie en proporción semejante.

Para que el K^+ pueda fluir libremente a través de la membrana es necesario que ésta, además de ser permeable para este catión, también lo sea para su contraión o pareja iónica, ya que ambos miembros de la pareja se atraen mutuamente por tener cargas eléctricas de signos opuestos. La pareja iónica del K^+ más abundante en el líquido intracelular son proteínas aniónicas (A^-) que no pueden atravesar la membrana por su gran volumen.

Por ello, se produciría un proceso osmótico, consistente en el paso de agua a través de la membrana plasmática hacia el interior de la célula, que aumentaría de volumen y diluiría sus componentes. Las consecuencias serían catastróficas ya que se reduciría la probabilidad de colisión molecular, e incluso es posible que la célula llegara a reventar (proceso conocido como lisis).

5. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que:

1. Es posible establecer un manual de uso técnico con instrucciones acerca del proceso de irradiación. Además el Laboratorio de Física de Radiaciones de la Universidad de Sonora se cuenta con el personal autorizado, la infraestructura, y el material necesario para llevar a cabo dicho procedimiento.
2. Los linfocitos inactivados por la radiación, presentan características electroquímicas diferentes del resto de las células vivas, en especial una impedancia muy alta.
3. La estabilidad morfológica leucocitaria se puede evaluar por medio de la tinción Giemsa de muestras de sangre periférica. En este punto se observaron sorprendentes efectos de destrucción morfológica leucocitaria radioinducidos que no se encuentran reportados en la literatura científica. En nuestro estudio fueron descritos como: (1) pérdida de la integridad celular en linfocitos a dosis de 3.21 a 10.29Gy, (2) fragmentación leucocitaria especialmente a los 20Gy, y (3) disociación lobular en neutrófilos a dosis de 50Gy y más. Estos mecanismos además se encuentran estrechamente vinculados con los aumentos de potasio intracelular.
4. La expresión de la proteína p53 incrementan significativamente en las muestras irradiadas directamente proporcional a la dosis de irradiación y el tiempo de almacén. Esto se encuentra fuertemente relacionado con las lesiones morfológicas radioinducidas en aquellas células con poca o nula probabilidad de reparación. En el caso del linfocito T la radiosensibilidad es más grande con respecto a las células B.
5. La calidad de la sangre irradiada puede ser monitoreada determinando la concentración de Potasio sérico usando el Vitalab Selectra. Así mismo, es importante notar que la sangre irradiada a 25Gy excede la concentración de potasio limite considerada de referencia (3.6 – 5.5 mmol/L) a las 48 horas posteriores a su almacén a 4°C, por lo cual si esta sangre es usada en medicina transfusional se recomienda transfundirla con el mínimo tiempo de almacenaje sin exceder estas 48 horas.

6. Finalmente, es posible establecer un protocolo de irradiación de sangre humana para el GC-220E que contengan aspectos técnicos del procedimiento, así como el estudio de la calidad y estabilidad del producto irradiado.

6. REFERENCIAS

1. AABB, Technical Manual, 14th ed. 2002. *Quality Systems in the Blood Bank Environment*. 2nd ed. 1999.
2. American Association of Blood Banks (AABB). Standards for Blood Banks and Transfusion Services. 19th edition. Bethesda. MD, American Association of Blood Banks, 1999.
3. American Association of Blood Banks (AABB). Blood Transfusion Therapy: a physician's handbook. 7th ed. U.S.: AABB; 2002.
4. AEA, (1985), High-dose Dosimetry, Proceedings of Symposium, Vienna, 1984, IAEA STI/PUB/671 (Viena: International Atomic Energy Agency).
5. Agarwal P, Ray VL, Choudhury N, Chaudhar. 2005. Effect of pre-storage gamma irradiation on red blood cells. Indian J. Med. Res. 122 (5):385-387.
6. B. Alberts y col. Biología Molecular de la Célula, 3^a ed., Editorial Omega, 1998, pp. 34-39, 78, 94.
7. Battista Borghi and Hanna van Oven. Reducing the risk of allogeneic blood transfusion. MAJ. 2002 February 5; 166(3): 332–334.
8. Benz EJ, Shatill SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, eds. Hematology. Basic principles and practice. 2.a ed. Nueva York: Churchill Livingstone, 1995; 1.870-1.878.

9. Billingham R. The biology of graft-versus-host reactions. Harvey Lectures 1966-67; 62: 21-78.
10. Brubaker DB. Human post-transfusion graft versus host disease. Vox Sang 1983; 45:401-420
11. CSTM Canadian Society for Transfusion Medicine Standards. 1st edition. Saskatoon, Canadian society for transfusion Medicine, 1997.
12. Chu RW. Leukocytes in blood transfusion: adverse effects and their prevention. Hong Kong Med J 1999; 5(3):280-4.
13. Góes E.G., M.A. Ottoboni, P.V.B. Palma, F.R. Morais, C.A. Pelá, J.C. Borges, D.T. Covas *Quality control of blood irradiation with a teletherapy unit: damage to stored red blood cells after cobalt-60 gamma irradiation.* Transfusion 1537-2995.2007.
14. Jarret, D.G. *Medical management of radiobiological casualties.* Handbook. December, 1999. United States Army, 1st edition.
15. Jones M, Sols M, Fraga J. Necrólisis epidérmica tóxica como manifestación de enfermedad injerto contra huésped cutánea grado IV. Actas Dermo Sif 1992; 83: 13-16.
16. License Amendments and Procedures for Gamma Irradiation of Blood and Blood Components US FDA, Center for Biologics Evaluation and Research, February, 2000.

17. Masood Awnar, Farhat Abbas Bhatti. *Transufion Asspcoated Graft-Verus host disease*. Armed Forces Institute of Phatology, Rawalpindi and *Armed Forces Institute of Transfusion, Rawalpindi, 2003.
18. Gillis S The thombocytopenic purpuras, recognition and management. *Drugs* 1996; 51 (6): 942-953.
19. Guide to the prepararation, use and quality assurance of blood components, 9th edition, Council of Europe, 2003.
20. Guidelines on gamma irradiation of blood components for the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease. BCSH Blood Transfusion Task Force. *Transfus Med* 1996;6:261-71
21. Guidelines for irradiation of blood and blood components. New York state Council on Human Blood and Transfusion Services, 2nd edition, 2004.
22. Guideliness on Gamma Irradiation of Blood Components for the prevention of Transfusuion-Association Graft-Versus Host-Disease, BSCH Blood Transfusion Task Force, February 1996.
23. Gulbahce, H. E., Charlotte A. B., Myra W., Segall M., Jessurun J. *Graft-Vs-Host Disese After Solid Organ Transplant*. American Journal of Clinical Pathology, 2003.
24. Gorlin J, Mintz P. Transfusion-associated graft-versus-host disease. In Mintz P (ed): *Transfusion Therapy: Clinical Principles and Practice*. Bethesda, Md, AABB Press, 1999; pp 341-57.

25. López de Roux María del Rosario y Cortina Rosales Lázaro. Daño pulmonar agudo relacionado con la transfusión. *Rev Cubana Hematol Inmunol.* 2005.
26. Masood Awnar, Farhat Abbas Bhatti. *Transufion Asspcoated Graft-Verus host disease.* Armed Forces Institute of Phatology, Rawalpindi and *Armed Forces Institute of Transfusion, Rawalpindi, 2003.
27. Minakawa : Proc., 19 (1943), 642.
28. Muñoz-Díaz E. Los riesgos de la transfusión y la hemovigilancia. En: Martín-Vega C, de Sousa G, Muñoz- Díaz E. Hemovigilancia/hemovigilancia. Barcelona (España): European School of Transfusion Medicine (ESTM) 2004;1-4.
29. Navarrete C. The HLA system in blood transfusion. In new aspects of blood transfusion. *Baillieres Clin Haematol* 2000;13(4):511-32.
30. Norma Oficial Mexicana. NOM-003-SSA2-1993. Para la Disposición de Sangre Humana y sus componentes con fines Terapeuticos. DOF. 20 de abril de 1994.
31. Ohto H, Anderson KC. Survey of transfusion associated graft-versus-host disease in immunocompetent recipients. *Trans Med Rev* 1996;10:31-43.
32. Operator's manual IN/OM 1894 GC220E.
33. Organización Panamericana de la Salud. Estándares de Trabajo para Servicios de Sangre. Washington: OPS; 2005.
34. Parshuram, J. Doyle, W. Lau, and S. D. Shemie. Transfusion-associated graft versus host disease. *Crit Care Med.* 3:57-62, 2002.

35. Pavel JD, Love CR. Programas educativos de los recursos de sangre nacionales. Guías para transfusión. Editorial Universitaria. Universidad de Puerto Rico, 1996.
36. Pelszynski, G Moroff, NL Luban, BJ Taylor and RR Quinones. *Effect of gamma irradiation of red blood cell units on T-cell inactivation as assessed by limiting dilution analysis: implications for preventing transfusion-associated graft-versus-host disease*. Volume 83, Issue 6, pp. 1683-1689, 1994.
37. Plumas, J. Manches O., Chapero L. *Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy in the control of GVHD: involvement of dendritic cells*. *Leukemia* (2003) **17**, 2061–2062.
38. Pujol-Moix, Núria Pujol-Moix. Trombocitopenias. 2da edición ISBN 8481745952, España. 2001.
39. Radillo González, A. Reacciones inmediatas de transfusión y su manejo, Reacciones tardías de la transfusión y su manejo. Medicina Transfusional. Ed. Prado 2ª. Edición. DF, México 2006. P. 609-657.
40. Rapaport FT, Dausset J. The possible role of leukocyte components in the production of the beneficial effects of blood transfusion in human transplantation. *Transplant Proc* 1983;15: 952-5.
41. Ruiz Argüelles Guillermo. Fundamentos de Hematología. México Editorial Médica Panamericana. 2da edición, 2001. pp31-44.
42. Trost : Zeits. f. Phys., 105 (1937), 399.

43. Vite Casanova M. Irradiación de Componentes Sanguíneos. *Bioquímica*. 2005; 30:59-62.
44. Weiss, M. Hoffmann, Medizinische Klinik A, *Gamma-irradiation of blood products following autologous stem cell transplantation: surveillance of the policy of 35 centers*. September 2003.
45. Zaguirre Ávila R., De Micheli Serra A., *En torno de la historia de las transfusiones sanguíneas*. *Rev Invest Clin* 2002; 54(6): 552-558.
46. Williamson L, Cohen H, Love E, et al. The serious hazards of transfusion (SHOT) initiative: The UK approach to Haemovigilance. *Vox Sang* 2000;78:2915.
47. World Health Organization. The clinical use of blood. Handbook. Ginebra: WHO; 2003.
48. Xavier Ortega Aramburu, Jaume Jorba Bisbal, Universidad Politécnica de Cataluña. Instituto de Técnicas Energéticas. 2000.
49. Zavizion B, Serebryanik D, Serebryanik I, Chapman J, Purmal A. Prevention of *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Pseudomonas putida* outgrowth in deliberately inoculated blood by a novel pathogen-reduction process. *Transfusion* 2003;43:135-42.

7. APÉNDICES

7.1 Dosímetros termoluminiscentes

Los dosímetros termoluminiscentes son sustancias, como el fluoruro de litio (LiF) o el fluoruro de calcio (CaF₂), que al recibir radiación muchos de los electrones producidos quedan atrapados en niveles de energía de larga vida, generalmente debidos a defectos en la red cristalina. Cuando posteriormente son calentados estos cristales, los electrones atrapados vuelven a caer a sus estados originales, al mismo tiempo emitiendo luz (de allí el nombre de termoluminiscencia). La cantidad de luz emitida es proporcional a la dosis acumulada desde la última vez que se calentó. Se mide con un fotomultiplicador.

Estos dosímetros son de costo moderado, resistentes y pueden ser usados varias veces. Son más precisos que los de placa fotográfica, pero se requiere de un equipo especial para efectuar las lecturas, las cuales no son inmediatas.

7.2 Contador Geiger-Müller

Un contador Geiger es un instrumento que permite medir la radiactividad de un objeto o lugar. Está formado por un tubo metálico herméticamente cerrado, en cuyo interior se ubica un conductor aislado (filamento de tungsteno), en la misma dirección del eje del tubo. Ese filamento es el ánodo. El cátodo es una capa fina de acero inoxidable que cubre la cara interior del cilindro y que sirve de cátodo. El cátodo está conectado a la tierra. En el interior del tubo se encuentra el gas argón a una presión de 260 mmHg, mezclado con algunos vapores orgánicos.

La alta tensión entre el cátodo y el ánodo ocasiona en las cercanías del filamento un campo eléctrico de gran intensidad. La tensión debe elegirse de manera de que no se produzca descarga espontánea. Una resistencia de 100 MW a 1000 W limita la corriente en caso de producirse una descarga a través del gas enrarecido (fig. 14).

La descarga luminiscente que dentro de poco tiempo rodea el filamento anódico debe producirse solamente a causa de la incidencia de partículas ionizadoras (alfa o beta) o rayos gamma. La descarga origina la existencia de una corriente a través de la resistencia, lo que provoca una caída de potencial entre sus extremos. Esto hace bajar la tensión entre el conductor central y las paredes del tubo de modo que la descarga cesa. A continuación la tensión adquiere nuevamente su valor inicial. Después de transcurrido el tiempo necesario para este proceso (tiempo muerto) el tubo se encuentra preparado para recibir nuevas partículas.

7.3 Marcadores de Superficie en Linfocitos

Los linfocitos y otros leucocitos, así como sus precursores hematopoyéticos, presentan patrones característicos de moléculas de superficie, que pueden ser aprovechadas como marcadores para distinguir y caracterizar distintas poblaciones celulares. Esta caracterización se realiza mediante anticuerpos monoclonales (AcMo); cada anticuerpo monoclonal distingue un solo tipo de molécula, e incluso partes específicas y variantes de cada tipo de molécula. La nomenclatura de estos anticuerpos se basa en los llamados grupos de diferenciación (CD, *cluster of differentiation*), los cuales consisten en todos los AcMo que reconocen una determinada molécula de membrana leucocitaria.

Cada célula T o B tiene alrededor de 1×10^5 moléculas en su superficie. Las células B están cubiertas con CD19, CD20, CD21, CD35, CD40, y CD45, además de otras moléculas no CD. Las células T tienen CD2, CD3, CD4, CD8, CD45R y otras moléculas no CD en su superficie (fig.15).

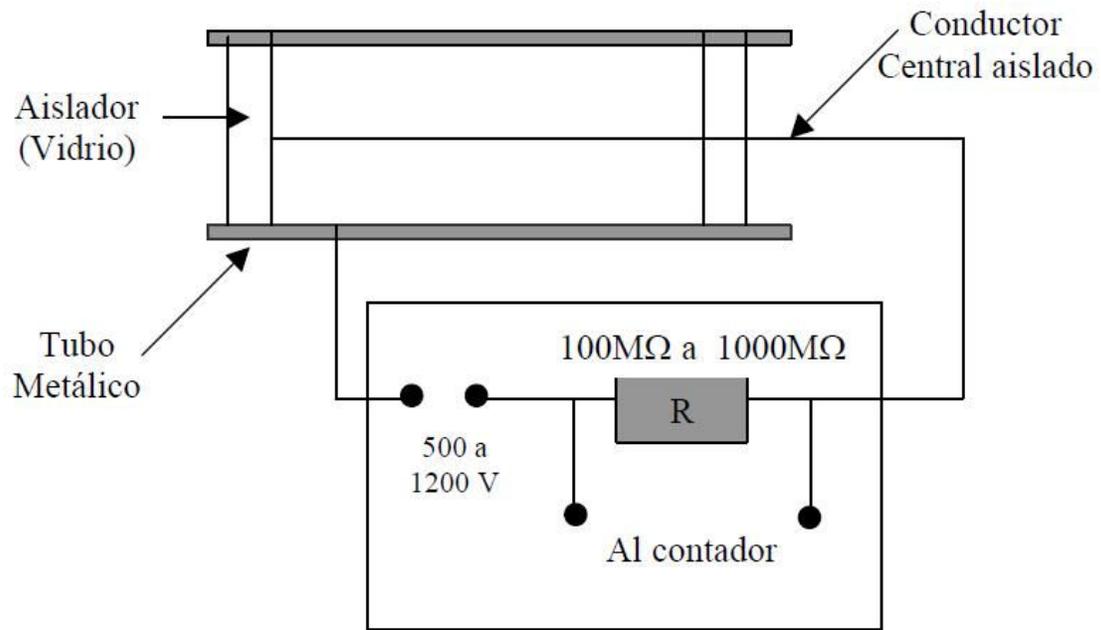


Figura 14. Modo de detección del Geiger-Müller.

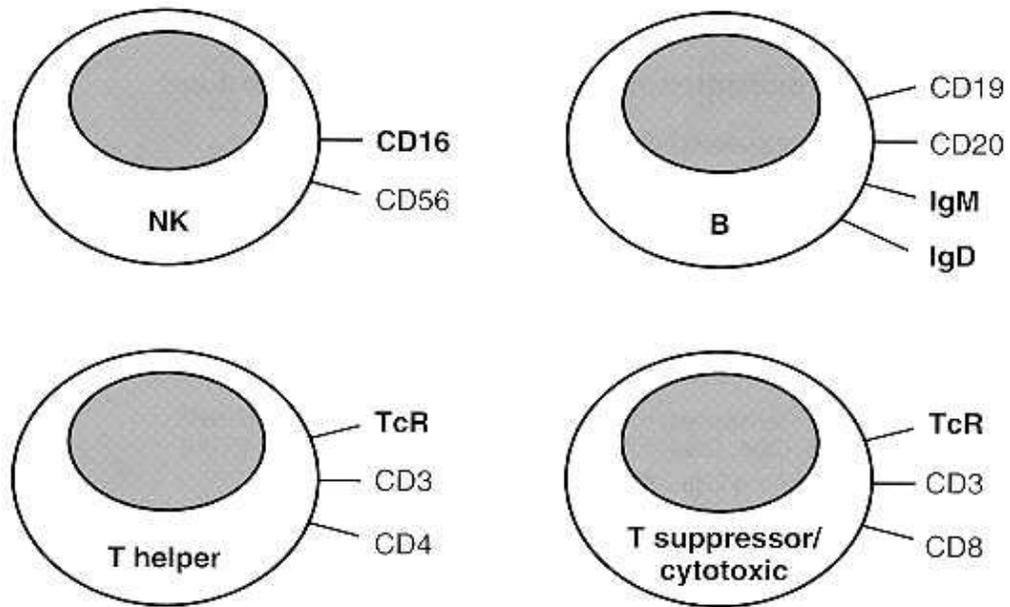


Figura 15. Marcadores de superficie en linfocitos

NK: natural killers por sus siglas en inglés, asesinos naturales; T helper (T cooperadoras); T supresore/cytotoxic (T supresoras/citotóxicas).

El gran número de moléculas en la superficie de los linfocitos permite una variabilidad en la forma de los receptores. Ellos son producidos en configuraciones aleatorias en sus superficies. Hay alrededor de 1×10^{18} receptores distintos diferentes estructuralmente. Esencialmente, un antígeno puede unirse muy perfectamente con una muy pequeña cantidad de linfocitos, quizás tan pocos como uno solo.

La unión del antígeno a receptores específicos de las células T o B inducen las respuestas efectoras en dos etapas. Primero, el antígeno es presentado a y reconocido por una célula T o B lo que lleva al cebamiento o preparación, activación y diferenciación, lo cual normalmente ocurre dentro de compartimentos especializados del tejido linfoide. En segundo lugar, la respuesta efectora tiene lugar debido a células T activadas que dejan el tejido linfoide y vuelven al sitio de la enfermedad o debido a la liberación de anticuerpos por células B activadas (plasmocitos) a la sangre o los fluidos tisulares y, de este modo, a los focos de infección.