

## Validación de Modelo Murino en la acción de sustancias Bioactivas (Scavengers), ante radiaciones ionizantes X

Verónica Martínez Marignac; Lucía Cervantes; Gloria Oertlin; José Favant; María F. Cantero

**Autoras/es:** Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos. Ruta provincial 11, km 10 Oro Verde, Entre Ríos, Argentina

**Contacto:** [fernandacantero@hotmail.com](mailto:fernandacantero@hotmail.com)

**ARK:** <https://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/6ckoudib5>

**Resumen:** Las fuentes de Radiaciones Ionizantes (RI), implican un riesgo físico bien reconocido para los seres vivos, incluso a dosis muy bajas. Para evaluar el daño de las RI nos vimos en la necesidad de generar un modelo animal validado (MAV). Se seleccionó la cepa de ratón Balb/c a los fines de hacer más probable la detección de daños por RI, por sus características fisiológicas, frente a otros animales sin estas características de deficiencias genética. Así, logramos obtener un MAV aceptable con resultados aceptables de Sensibilidad y Especificidad, para dos de las técnicas usadas en nuestro laboratorio.

Una vez establecido el MAV, lo enfrentamos a sustancias bioactivas naturales (SBAs), las cuales se suministraron con un preparado comercial de infusión, ad libitum una semana antes y una después del momento de su irradiación. Al mismo tiempo se utilizó como referencia interna de SBA a la vitamina C, dado sus conocidos efectos barredores (scavengers) de radicales libres (RL) producidos por los RX. Se demuestra justamente, una acción radioprotectora de la SBA de prueba en el MAV, actuando como SBAs no tóxicas y no genotóxicas. Con el suministro de SBAs, se inicia un cambio de paradigma preventivo en radioprotección, favoreciendo la eficiencia en mecanismos barredores naturales.

**Palabras claves:** Radiobiología – Fuentes de Rayos X – Radioprotección – Ratones Balb/c-Sustancias Scavengers.

## Objetivos

### Objetivo General:

- Validar un modelo animal experimental (MAV) en ratones machos adultos Balb/C, expuestos deliberadamente a cantidades conocidas de RX crecientes (de muy bajas dosis y tasas de dosis), y valorar la acción radiomitigante /radioprotectora de las Sustancias Bioactivas (SBAs) naturales aplicadas al mismo.

### Objetivos Específicos:

- Diseñar y optimizar el MAV (descripto en Protocolo).
- Validar por criterios de especificidad, sensibilidad y otros estadígrafos, la potencia de valor predictivo de las técnicas de laboratorio. Para tratar de medir en el modelo animal el daño por RIs, en algún orden de magnitud repetible.
- Verificar la eficiencia de acción de sustancias exógenas (SBAs) de origen vegetal natural en tal MAV, sencilla de preparar, administrar y que resulte no tóxica.
- Validar el MAV definitivo para evaluar SBAs, barreores de especies reactivas, siendo el compuesto de referencia la vitamina C(ácido ascórbico), de reconocida acción barredora de RL o scavenger.

## Marco teórico

Las Radiaciones Ionizantes (RIs) son aquellas radiaciones con suficiente energía como para arrancar electrones de los átomos o moléculas, ionizándolo. Las mismas se clasifican según su naturaleza en RIs electromagnética como por ejemplo RX y Rayos gamma; y RIs particuladas como por ejemplo partículas alfa, betas y neutrones. La particularidad de las RIs, es que ninguno de nuestros sentidos es capaz de percibir su presencia ni mucho menos su intensidad (Martínez Marignac et al, 2020).

### Fuentes de Radiaciones Ionizantes:

Las fuentes de RIs se clasifican de acuerdo a su origen en fuentes naturales y artificiales (FN y FA) (Dobrzański et al, 2015). Las FN se hallan a nuestro alrededor, como el radón en la tierra, que se forma a partir de la descomposición del uranio del suelo y rocas, las radiaciones cósmicas que proviene del sol y otras fuentes celestiales, e incluso dentro nuestro como por ejemplo Potasio 40 y el Carbono 14. Este valor de fondo natural ambiental (FNA) es más o menos homogéneo en todo el mundo (Berrington de Gonzalez et al 2020, Hauptmann et al, 2023; Nobuyuki et al, 2014).

Dentro de las FA encontramos aquellas utilizadas para uso médico, como es el caso de producción de imágenes radiográficas. También es común el uso de RI en industrias, esterilización y escaneos con RX como procedimientos de seguridad (Kitahara et al, 2018; Morgan y BWJ, 2013; Preston et al, 2016).

### Interacción de las Radiaciones Ionizantes:

Se sabe que cuando las RI impactan con las células vivas, pueden dañar la célula en forma directa, cuando la RI daña las cadenas del ADN, o en forma indirecta, cuando la RI rompe enlaces de moléculas que componen a la materia viva, dando origen a grupos reactivos denominados radicales libres (RL). La generación de RL sucede al donar un electrón no apareado de un átomo o molécula a otras especies cercanas, o bien al traspasarle un electrón a otra especie química de modo sucesivo e indefinidamente en el tiempo, sucediendo esto dentro y fuera de las células (de Toledo et al, 2017; Martínez

Marignac et al, 2019) que a su vez pueden romper enlaces entre átomos de tales moléculas o bien producir alteraciones y cambios en ellas.

Los RL del oxígeno son uno de los responsables del envejecimiento celular junto a otra serie de procesos complejos de los ciclos celulares, que provocan daños de sus componentes biomoleculares, que a su vez en ocasiones inician el proceso del cáncer y otras patologías asociadas (Martínez Marignac et al, 2019; Hauptmann et al, 2023; Kitara et al, 2018; Berrington de González et al, 2009).

### **Efectos de las Radiaciones Ionizantes:**

Los efectos de las RI se clasifican, en determinísticos y estocásticos. Los efectos determinísticos se caracterizan porque la dosis de RI absorbida por el individuo es suficiente como para inducir daños con sintomatología física, que pueden manifestarse luego de unos minutos, horas o días a la exposición a la fuente radiactiva. La severidad del daño depende de la dosis absorbida, que va desde náuseas, vómitos y fatiga, hasta inclusive la muerte.

En cambio, los efectos estocásticos pueden tardar muchos años en manifestarse clínicamente de alguna manera (Grajewski et al, 2015). Las dosis absorbidas para este tipo de efecto se encuentran actualmente en el orden del FNA anual, es decir unos pocos mSv al año (Azzam et al, 2012; Memon et al, 2019; Miousse et al, 2017). Un límite entre efectos Estocásticos y Determinísticos, para mamíferos, se encuentra en el orden de los 100 mSv (Nobuyuki et al, 2014).

Las enfermedades humanas inducidas por altas dosis de radiación son bien conocidas, por datos procedentes en sobrevivientes por su uso bélico que determinó el final de la Segunda Guerra Mundial (en Hiroshima y Nagasaki) y en diversos accidentes (Chernóbil) con fuentes nucleares de alta Actividad (Little et al, 2021; Martínez Marignac et al, 2019; Wong et al, 1993).

Los efectos por exposición a bajas dosis y a bajas tasas de dosis en la salud animal (Khan et al, 2017; Martínez Marignac et al, 2020 y 2023; Williams et al, 2010) y humana aún se mantienen con grandes controversias (Little et al, 2021; Grajewski et al, 2015; Hauptmann et al, 2023; Isubakova, et al, 2021; Kitahara et al, 2018; Miousse et al, 2017). En humanos se han informado riesgo a cáncer en trabajadores de radio imágenes y en niños con bajas tasas y dosis (Linet et al, 2012; Little et al, 2009). Los estudios experimentales en animales indican que la radiación ionizante de baja dosis agudas o crónicas ( $\leq 100$  mSv) o aquellas exposiciones a RIs de bajas tasas de dosis ( $< 6$  mSv/h) pueden ser dañinas. Induce cambios genéticos y epigenéticos, y está asociado con una variedad de trastornos fisiológicos que incluyen alteración del sistema inmunitario, desarrollo cerebral anormal con deterioro cognitivo resultante, catarata génesis, desarrollo embrionario anormal, enfermedad circulatoria, aumento de peso, menopausia prematura en hembras, tumorigénesis y acortamiento de la esperanza de vida. La exposición paterna o prenatal a bajas dosis y tasas de dosis, se asocia con una reducción de la fertilidad y del número de hijos vivos, de fetos y aberraciones genómicas transgeneracionales (Williams et al, 2010; Martínez Marignac et al, 2020 y 2023; Vaiserman et al, 2018). Por otro lado, en otros estudios experimentales, también se ha informado que la exposición a bajas dosis produce efectos beneficiosos, como la reducción de la tumorigénesis, la longevidad prolongada y mayor fertilidad (Feinendegen, 2005). Las diferencias en los efectos informados de la exposición a bajas dosis y tasas de dosis en diversos modelos animales, dependen entonces de la edad al ser irradiados (días prenatales o posnatales), de los antecedentes genéticos de los animales (lo que marca su susceptibilidad), del sexo, del tipo

de irradiación o exposición a la que se someten (es decir, si la exposición a la RI es aguda, fraccionada o crónica; o si es a cuerpo entero, o solo una parte del mismo), del tipo o clase de fuente de RI usada con el modelo animal, de la combinación de radiación con otros agentes tóxicos (como fumar, pesticidas u otras toxinas químicas) o de los diseños experimentales mismos con los animales (Morgan et al, 2013).

### **Seres vivos y modelos animales usados en el estudio de efectos de las RI:**

El modelo animal tanto de ratas albinas y de cepas de ratones, es apto para ser expuesto a grandes cantidades de RIs como ha sido demostrado por muchos investigadores (Schiesti, 2013; Campbell y Dachs, 2014; Williams et al, 2010), pero puede que los resultados no sean adecuados para el estudio del efecto de cantidades de RIs del orden del valor del FNA, debido a que estas poseen una alta capacidad de reparación de su genoma (Chatterjee y Walker, 2017; Jeggo et al, 2016). Actualmente, el arsenal del investigador incluye modelos murinos que van desde tumores inducibles por carcinógenos hasta modelos de xenoinjertos trasplantados con células neoplásicas humanas a ratones humanizados que expresan genes humanos. Las nuevas generaciones de Ratones Genéticamente Modificados (GEM, por sus siglas en inglés, o RGM en castellano) se han imbuido de la capacidad de recapitular con precisión las características fisiopatológicas y moleculares subyacentes de muchos tipos de cánceres humanos (Goodwin et al, 2016).

Como cepas de ratones GEM, donde se incluyen modelos murinos que imiten las patologías moleculares subyacentes observadas en el ser humano, podemos citar a:

**La cepa del ratón RF**, que se desarrolló en el Instituto Rockefeller como un stock de propósito general de las cepas A, R y S. Se han estudiado ampliamente su propensión a la leucemiogénesis inducida por radiación. La leucemia mielógena o mieloide (ML) en el modelo RF es inducible con una dosis única de radiación ionizante (Biedermann et al, 1991; Russu et al, 2023).

**La cepa del ratón SJL/J**, fue desarrollada en la década de 1960, y es conocida por su alta frecuencia espontánea de neoplasias de células reticulares (tipo B, RCN B) que aparecen aproximadamente a un año de edad, tanto en machos como en hembras. El patrón histológico observado fue similar al de la enfermedad de Hodgkin en humanos, por lo que se propuso su uso como modelo de investigación de este tipo de lesiones (Biedermann et al, 1991; Russu et al, 2023).

**La cepa del ratón CBA**, es un cruce entre una hembra albina Braga y un macho DBA desarrollado originalmente en 1920 con baja incidencia de tumores mamarios. Una irradiación de 3,0 Gy (3,0 Sv) con rayos gamma o RX de ratones machos CBA/H de 12 semanas da como resultado una inducción del 25 % de leucemia mieloide (Biedermann et al, 1991; Russu et al, 2023).

**Las cepas de los ratones C57BL**, se desarrollaron en 1921 como un cruce entre hembra 57 y macho 52 del stock de Miss Abbie Lanthrop. Es una de las cepas de ratón más utilizadas en el laboratorio. Hasta el 7 % de los ratones C57BL/6 desarrollan leucemia espontánea. Ya en 1949, pudieron inducir linfoma tímico en ratones con RX. (Biedermann et al, 1991; Russu et al, 2023).

**El ratón cepa BALB/c**, es una cepa endogámica obtenida en 1913 y ampliada aún más en 1932, donde posteriormente se agregó la designación /c para reflejar el locus de color homocigoto "color". Es una de las cepas más utilizadas y supuestamente no desarrolla leucemia linfática, pero es sensible a la letalidad de la radiación (Russu et al, 2023).

De este modo, la cepa de ratón Balb/C es reconocida porque sus células son extremadamente sensibles a la inhibición post agrupación por la división celular. Los especímenes completos de ratones Balb/c, tanto como sus líneas celulares en cultivos, se usan ampliamente en la investigación de la carcinogénesis, porque sus respuestas inmunológicas están relativamente inhibidas (Nakamura, 2013; Sato et al, 2015). Nakamura H., (2013) es quien dedica un capítulo especial a la cepa Balb/C y sus propiedades respecto de sus limitaciones funcionales para la reparación de estructuras celulares. También se utiliza para experimentos en ciencias biotecnológicas, como modelo caracterizado en oncología y en comparación con otros ratones con mayor inmunocompetencia (Williams et al, 2010, Witt et al, 2008).

Sin embargo, hay muchas incertidumbres en la estimación de la incidencia respecto de riesgos asociados con la exposición a muy bajas dosis y a muy bajas tasas de dosis, en función de diversos estudios publicados.

### **Sistemas de Radioprotección endógenos y exógenos:**

Las células poseen mecanismos que generan sustancias que reducen los efectos de las RIIs en los tejidos sanos y promueven su reparación (Martínez Marignac et al, 2019 y 2020).

Existen tres clases potenciales de agentes exógenos destinados a modular el daño tisular normal: (1) protectores de radiación o radioprotectores, agentes administrados antes de la exposición a la radiación; (2) mitigadores de radiación o radiomitigadores, agentes administrados después de la exposición (PE) pero antes del inicio de los síntomas; y (3) terapias o agentes administrados después de la aparición de los síntomas. Hasta la fecha, Amifostina® es el único agente aprobado por la FDA destinado a proteger tejidos normales durante la irradiación (Schiesti, 2013).

Estos compuestos generalmente se caracterizan por la capacidad de reducir la radiotoxicidad, barriendo RL y produciendo cierta protección en las células normales y en las afectadas, llevando la probabilidad de daño a un mínimo, disminuyendo razonablemente su transformación en tumorales y que puedan generar distintos tipos de cánceres a largo plazo (Cheki et al, 2016; Leonard et al, 2006; Tang et al, 2020). Hay numerosos estudios que proponen terapias con SBAs que podrían explorarse con más detalle, para desarrollarlos como agentes radioprotectores naturales, que no resulten tóxicos y además con propiedades anticancerígenas (Martínez Marignac et al, 2020)

## **Materiales y métodos**

### **Materiales:**

**Animales de experimentación:** Se llevaron a cabo tres ensayos experimentales consecutivos en dos años, con lotes de ratones machos, cepa Balb/c con ya 4-5 semanas de vida, adquiridas al Servicio Centro de Experimentaciones Biológicas, de la Universidad Nacional del Litoral. Las dos primeras poblaciones que se adquirieron para llevar adelante los experimentos fue primero con Lote N° 1, N = 54 y segundo el Lote N° 2, con N=50 en un periodo aproximado de un año calendario (2018). Por último, en el año 2019 se realizaron experimentos de SBAs con el lote N° 3 de la misma especie de ratones con N= 56. Cada lote se dividió en sublotes según la dosis efectiva que iba a recibir cada uno y un sublote de no irradiados. Por lo tanto, quedaron conformados los sublotes del lote 1 como D1 = 12 mSv ± 40%; D2 = 25 mSv ± 32%; D3 = 50 mSv; ± 27%;

D4 = 100 mSv;  $\pm$  19%; D5 = 200  $\pm$  15%. En el lote n° 2 de estos ratones, se usaron solo las dosis 1 a la 4. En el lote n° 3 solo se usaron las 3 primeras dosis, ya que solo se cuenta con 56 animales y necesitamos muchas alternativas distintas que analizar. La división se realizó de la siguiente manera, en irradiados a dosis crecientes de RX (D1, D2 y D3), en No irradiados o controles; en irradiados con dosis crecientes de RX+SBA (D1+ SBA, D2+ SBA y D3+ SBA); en irradiados con dosis crecientes de RX+ VitC (D1+ VitC, D2+ VitC y D3+ VitC); en no irradiados +SBAs; en no irradiados +agua ad libitum, quedando de aproximadamente 5-6 ratones que se repartían en cajas diferentes. Vale aclarar que los lotes de ratones contaban con certificados de ser libres de microorganismos patógenos o de enfermedades transmisibles, además de estar en condiciones de usarse en pruebas biológicas según Normas Nacionales e Internacionales (SENASA, ANMAT, OPPT, OECD, FDA y EPA); como de la misma forma en planificación y desarrollo de ensayos preclínicos según Normas Nacionales e Internacionales (ANMAT, FDA, EMEA).

**Bioterio del laboratorio IBioGeM:** Jaulas de acrílico; biberones de vidrio; Sistema de ventilación con filtros; Estantes para las Jaulas y puerta de cierre; acceso restringido al Bioterio; sitio de limpieza y desinfección regular de las jaulas; material de limpieza, jabón líquido y desinfectantes en cantidades suficientes; equipamiento e indumentaria de protección personal en cantidades suficientes; Señalética de medidas de preventión; cajas contenedoras de alimentos; cajas contenedoras de aserrín esterilizado para cambio de camas en las jaulas; agua potable en bidones comerciales; balanza digital con Tara para pesar los animales, marca Sartorius ® de sensibilidad de 1/10 de gramo, aunque en los registros solo se registraba hasta una cifra significativa después de la coma.; cuaderno – Acta de Registros; papel absorbente en rollo; Etanol 70%; bisturíes estériles; agujas estériles 25/8; agujas estériles tipo tuberculina; cinta adhesiva de papel; marcadores indelebles; pizarra para mensajes; equipo de climatización ambiental automático; reloj automático para el ciclo día/noche de los animales de experimentación; cámaras de fotos para registros; guantes de látex y de acetato nitrilo de un solo uso; jeringas estériles descartables de 1 ml, 5 ml y 10 ml; termómetros ambientales analógicos de bulbo con mercurio y de bulbo con alcohol; Protocolo de recepción de animales, Protocolo de mantenimiento y cría en bioterio ad hoc, controles programados establecidos en la población de animales durante su estadía. En breve el bioterio se halla adherido a los servicios del Sistema Nacional de Bioterios desde 2019, por resolución 2019-86-APN-SECAC#MECCYT, actual área infraestructura de la Agencia de CyT.

**Fuente de Radiación:** El equipo utilizado pertenece al Servicio de Radiología del Hospital San José de Diamante, Entre Ríos, Argentina, para radiodiagnóstico marca Dynan AF500 (Dynan SA, Argentina), que puede ser operado con valores desde los 40 Kilo Volts (KV) y 50 mili Amperes (mA) en adelante.

**Dosímetro:** dosímetro tipo Geiger – Müller, marca Monitor4, calibrado por el proveedor. Posee un selector de escalas de lectura analógica que va desde los micro Roentgen ( $\mu$ R) / hora (h), hasta el orden decenas de Roentgen / hora.

**Sustancias Bioactivas (SBAs):** Se les administró a los ratones como SBA el Té Essiac®, adquirido comercialmente, a Genuine Essiac, (Massachusetts-USA) que se trata de una mezcla de hierbas de origen natural (Martínez Marignac et al, 2020). También a algunos sublotes se le administro vitamina C, Vacunace- Casasco SA-Argentina como sustancia control o de referencia interna, cuyos efectos antioxidantes son ya descriptos por la bibliografía (Sato et al, 2015; Seo y Lee, 2002).

**Declaraciones del autor:** Expreso no tener ningún compromiso o conflicto de intereses con la firma que produce el producto denominado Te Genuine Essiac ® utilizado como SBA. La misma se seleccionó incluso de una forma azarosa, al ser hallada su existencia en un negocio del ramo de la herboristería o de Hierbas medicinales naturalistas. Por otra parte, se menciona en la Bibliografía, que hay otras publicaciones de investigación de las propiedades de este té, como en casos de atenuación del envejecimiento o EROs. Declaro que tampoco tengo algún otro conflicto de intereses con equipos, insumos, animales de experimentación o instrumental citados y descriptos aquí.

### **Método:**

Los ratones Balb/c distribuidos en jaulas, fueron criados y mantenidos adecuadamente, en condiciones de ciclo diario de luz/oscuridad, de temperatura, humedad y presión ambiente agradables, con alimentos y agua ad libitum, en el Bioterio del Laboratorio Ibiogem del CICYTTP -CONICET, Provincia de Entre Ríos.

En las semanas 10-12 se sabe por la bibliografía que ya son adultos (Moreira et al, 2015). Por esta razón es que, a partir de este tiempo, se elige realizar las exposiciones en cada lote previamente establecido, con cantidades crecientes de RX.

Las irradiaciones son llevadas a cabo en el equipo de RX antes descripto. También se realiza el control de peso semanal en todos los lotes, para controlar posibles cambios de estado de salud y crecimiento. Tomas de muestra de sangre a la semana de la exposición a RI para cada lote subdividido a priori según las dosis crecientes a las que son expuestos. Con las muestras de sangre anticoaguladas se realiza un control de indicadores hematológicos y también se aprovechan las muestras de sangre en simultáneo, para los %EC y %Reticulocitos Ó %EMN, en sangre periférica. Luego de la semana 24-25 se realiza sacrificio de todos los lotes para extraer muestras histológicas y últimas de sangre.

**Cálculos de Dosis Efectiva (E), recibida por cada lote animal:** Se calculan a partir de las tasas de irradiación, transformándose los valores de tasa de exposición a términos de unidades de dosis efectiva (E) en mili Sieverts (mSv), nuestra unidad de interés. A fin de correlacionar las RI en cantidades crecientes (RX) respecto de efecto daño, medible en variables biológicas a nuestro alcance.

Antes de irradiar a los animales de experimentación, se realizan mediciones en aire y agua (fantoma), a un metro de distancia de la fuente de la tasa de irradiación de los disparos, con el dosímetro. Se procede así a los fines de asegurar luego con cálculos, cuáles serán las dosis absorbidas (D) y las Efectivas (E) recibidas por cada lote y su valor de incerteza respecto del valor promedio. De modo que el conjunto de valores de los disparos (fijadas las condiciones de emisión por la fuente), resulte reproducible en el tiempo para diversas ocasiones (esto significa, disparos efectuados en el orden de meses de diferencia entre los distintos experimentos), y que entre en el rango de medida del dosímetro portátil.

Se calculan los valores promedios para cada cantidad de RI a recibir por cada uno de los sublotes de animales planificados. En términos breves, por medio de los controles de disparos, estas resultaron ser denominadas como D1, D2, D3 y así sucesivamente. En valores promedio de dosis Efectivas (E) del lote 1: **D1 = 12 mSv; D2 = 25 mSv; D3 = 50 mSv; D4 = 100 mSv; D5 = 200 mSv, D6 = 300mSv y D7=600 mSv;** respectivamente para el lote n° 1 de ratones macho Balb/C. En el lote n° 2 de estos ratones, se usaron solo las dosis 1 a la 4. En el lote n° 3 solo se usaron las 3 primeras dosis.

**Control de peso:** Cada 1-2 semanas se hacen medidas del peso corporal en gramos y se calcula el promedio en cada jaula, dejándose registro de estos datos en forma

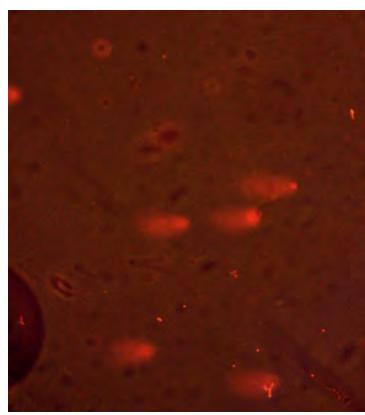
manuscrita en un cuaderno *ad hoc*. Estos datos luego se trasladan regularmente a archivos digitales en la PC del Ibiogem, y se llevan a tablas de Excel®. Se mantienen actualizados los registros hasta el final de los experimentos, y se analizan los datos en su conjunto.

**Observación de cortes histológicos:** Colon: Tinción nuclear; tinción citoplasma; relación citoplasma/núcleo; tamaño de criptas; relación distancia membrana basal/muscular; tejido linfoide; tamaño y morfología de nódulos Linfáticos; Presencia o no de Infiltración por Linfocitos. glotis, tiroides y tejidos anexos de la zona: Folículos tiroideos; cartílagos.

**Control de indicadores hematológicos:** Se realizan recuentos sistematizados de Glóbulos Blancos (GB), la Formula Leucocitaria absoluta y relativa, y ensayos de Micronúcleos (%EMN) para medir el porcentaje de reticulocitos en sangre periférica usando fluorocromos y Microscopio de Fluorescencia en todos los sublotes de ratones, no irradiados e irradiados con distintas cantidades crecientes de RX. Desde el momento en que se consideraban adaptados al bioriego, se les extraen muestras de sangre desde la semana 8-9 de vida. Se obtienen datos en conjunto de los no irradiados y se los toma como rango de Valores Normales con sus correspondientes desviaciones estándar. A la semana posterior de ser irradiados (semana 13-14 de vida) se les extrae nuevamente sangre a cada sublote y se determinan en paralelo todos los recuentos de los indicadores hematológicos. Todos estos registros de datos, se comparan para determinar si existen diferencias significativas entre los irradiados y los no irradiados. El porcentaje de reticulocitos o micronúcleo es un ensayo de relevancia en daño genotóxico, principalmente evidencia daño citogenético (Vasquez, 2010).

**Ensayo cometa. Recuento relativo de ensayos cometa positivos (%EC+):** Desde hace varias décadas el Ensayo Cometa, o electroforesis alcalina de células individuales, se ha convertido en un método establecido para el estudio del daño de ácido desoxirribonucleico, con múltiples aplicaciones en ensayos de genotoxicidad, estudios de biomonitorreo en humanos, epidemiología molecular y eco toxicología; así como una herramienta fundamental para investigaciones sobre daño y reparación del ADN (Martínez et al, 2010)

**Figura N° 1.** Microfotografía de Ensayo Cometa. (Foto Propia).



**Figura N° 1:** Microfotografía de Ensayo Cometa. (Foto Propia). En el centro izquierda del campo microscópico se ven tres células fantasma que se dirigen hacia la derecha, y por delante desenfocada (por estar en otro plano fuera de foco) hay otra célula fluorescente. La célula superior y la inferior son cometas bien diferenciados, donde se observa material genético cual barrilete de longitud varias veces el tamaño del diámetro del núcleo que se ve por delante más a la derecha.

Cada una de las muestras duplicadas de cada portaobjetos, se observaron con un microscopio de fluorescencia LED Leika DM500. Para cada portaobjetos procesado para ensayo cometa, se tomaron imágenes y se realizó el conteo de unas 100 células seleccionadas recorriendo al azar la muestra. Las imágenes de los cometas se registraron y analizaron utilizando una cámara digital Amscope de 14 Mega Pixeles (Amscope, EE. UU.). Las células se clasificaron como no cometas o cometas de acuerdo a la presencia o no de su cola (desde sin daño: clase 0 hasta daño: clase 1 o 2), por lo que resultó en una única puntuación de daño en el ADN (daño o porcentaje de cometa +) para cada muestra de cada animal en su lote respectivo. Los perfiles de células cometas con el tamaño de al menos uno o dos diámetros nucleares se tomaron como (+), y los de cabeza pequeña o inexistente, sin una cola prominente y difusa no se puntuaron debido a la posibilidad de que fueran células apoptóticas o necróticas.

Este ensayo se distingue por su sensibilidad, versatilidad, relativa rapidez y relativa economía, aunque es necesario contar con un MF y todo un abanico de insumos en sí bastante costosos. Se basa en la visualización microscópica de las imágenes del ADN después que las células son embebidas en agarosa, lisadas sus membranas y sometidas a la acción de un campo eléctrico constante (electroforesis) en medio alcalino. Esta metodología permite, detectar con alta sensibilidad una gran variedad de daños del ADN en muchos tipos de células (Martínez et al, 2010).

**Método de Validación del Modelo Animal:** Para llegar a tener un MAV, es necesario realizar repetidamente una serie de pasos y contar con materiales, que se mantengan y respondan en condiciones similares, en cada oportunidad en que se repita este experimento con los sucesivos lotes. Como en este caso, por ejemplo, eran necesarios además de la cepa de ratón o espécimen animal, una gran cantidad de instrumentos, insumos y su preparación, personal dedicado. Asimismo, es necesario asegurar que todo funcione con un mínimo de errores o incertezas, que puedan ser ajustadas hasta un grado razonable, para que los resultados a interpretar a posteriori sean repetibles y confiables. Para ello se tuvo en cuenta para cada uno de los lotes con los que se experimentó sucesivamente, que se hallen sujetos a una serie de pasos, de modo que sean comparables los estudios de los posibles efectos a bajas dosis a partir de fuentes de Rx.

Los resultados de las técnicas de laboratorio, en caso de detectar diferencias asociadas a dosis o tasa de dosis, se determinarán los requisitos mínimos estadísticos como el % de Sensibilidad, % de Especificidad, asignarle un %Prevalencia razonable, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, Razón de verosimilitud positiva o cociente de probabilidades positivo,

Razón de verosimilitud negativo o cociente de probabilidades negativo y exactitud.

**Protocolo llevado a cabo, para la validación del modelo animal (MAV):** 1° Es imprescindible poder contar con la provisión regular y segura de la cepa de la especie animal seleccionada. A los fines de tener la cantidad y calidad uniforme desde el punto de vista genético de estos, como asimismo estén certificados como libres de portar microbios peligrosos para quienes los manipulen o estén en contacto frecuente con ellos. En nuestro caso elegimos la cepa Balb/C, por poseer conocidos defectos genéticos, útiles en la práctica para amplificar la probabilidad de detección de daños. Debe preverse la compra de animales, en un numero previo evaluado respecto a la capacidad del Bioterio con que se cuente, y acordar su retiro con el generador/proveedor, unos 60 a 90 días antes. Los espécímenes se trasladan ya con 4-5 semanas de vida, al bioterio del Laboratorio Ibiogem, el cual pertenece al Registro Nacional de Bioterios en Argentina. Los métodos,

procedimientos, técnicas de extracción, de experimentación y posterior sacrificio de los animales, es recomendable que sean aprobados por un comité de Bioética.

2º Consideraciones sobre el bioterio. Elegir un espacio físico dedicado, de medidas suficientes para circular como mínimo dos personas y contar con un área donde ubicar las cajas-jaulas, como una alacena con estantes, donde permanezcan los animales el tiempo necesario de duración del experimento (unas 20 semanas por lote). Debe contar con ventilación controlada y renovación del aire filtrado, luminarias, termostatización o climatización y control diario de parámetros del ambiente del bioterio (en aspectos de temperatura, presión barométrica, % de humedad, ciclo de luz día/oscuridad). Controlar en forma periódica con instrumentales específicos como: termómetro ambiental, humidímetro, barómetro, sistema de climatización, pre filtros y filtros, reloj electrónico para control del ciclo noche /día de 12 horas y 12 horas. Cuaderno para llevar registros y comunicaciones, donde tomar notas del valor de estas variables y de toda novedad diaria. Proveer de agua mineral y comida ad libitum a través de biberones y comederos ad hoc. Cajas- jaulas que contengan no más de 4-5 animales /caja.

Al mismo tiempo es necesario contar con los insumos suficientes para 20 semanas, de elementos de higiene y limpieza tanto ambientales como personales (desinfectantes, detergente cepillos y guantes de limpieza). Es ideal poseer un ambiente vecino al bioterio donde efectuar la limpieza, desinfección y secado de cajas (con pileta y desagües, con agua corriente de buena calidad y potable, sin durezas). Proveer de aserrín estéril para el cambio de camas semanal. Establecer recipientes marcados para depositar residuos comunes y residuos del cambio de camas, con bolsas de residuos diferenciadas, de unos 5- 10 litros de capacidad. Se debe contar con balanza electrónica con sensibilidad de 1/10 de gramo y tara automática; un vaso de precipitado de 1 lt para pesar animales individualmente. Medir y calcular luego el peso promedio de los animales para cada jaula o situación de no irradiados e irradiados según su cantidad de Rx recibida, y/o de cada otro sub-lote. Debe haber una mesada en el bioterio, para realizar las tomas de muestras (sangre) individuales de cada animal de experimentación. Deben estar en el lugar, indumentarias de uso personal como batas u otra vestimenta limpia y adecuada de uso para el bioterio y el laboratorio. Se recomienda tener otros insumos de un solo uso como guantes, etanol 66°, servilletas desechables, gradillas tubos capilares de micro hematocrito con anticoagulantes, tubos con tapones gradillas, tubos Eppendorf, marcadores indelebles, agujas estériles, bisturíes y lancetas, algodón, gasas. Es necesario otro espacio físico de laboratorio, además del bioterio, donde se procesen las muestras, fundamentalmente las de sangre de los ratones Balb/c. A la par un número de animales por lote en nuestro bioterio, que sabemos de antemano podemos manejar de acuerdo a la regla de las 3 R's, en este caso resulta entre 50 – 55/ lote.

3º Dividir y/o subdividir los animales en sublotes, los animales en el laboratorio, a las 4-5 semanas de vida, se reparten en cajas-jaulas de acuerdo a las diferentes cantidades de Rx a los que se los va a irradiar, en cajas convenientemente marcadas. Según la bibliografía consultada, se sabe que a partir de la semana 12 de vida, los ratones machos Balb/C son adultos (Moreira et al, 2015)

4º Control de disparos del equipo de RX, desde la recepción de los animales hasta la semana 12 se toman medidas dosimétricas en el equipo de Rx hospitalario. Se efectúan disparos de RX al aire, alternados con disparos en fantomas de agua (bolsas de 25 gramos agua), junto al dosímetro, a un metro de distancia bajo la fuente de RX. Las cantidades emitidas por el equipo de RX se ajustan con ayuda del control digital del

equipo. Es necesario asegurar que las lecturas y todos los parámetros a fijar generen cantidades uniformes y repetitivas de Rx en la zona de irradiación en sus respectivas cajas. Los disparos que se efectúan del equipo de RX de este modo, se miden con el dosímetro calibrado. El haz de Rx es colimado al tamaño de la jaula.

5º Programar el transporte seguro de los ratones: al acercarnos a la fecha de irradiación semanas 12 a 13 de vida, el transporte de los animales se hace en sus propias cajas-jaulas cerradas ya rotuladas, en un móvil ad hoc climatizado, hasta el sitio donde se encuentra la fuente o equipo hospitalario de Rx diagnóstico (conviene establecer un convenio de Conformidad con la institución o servicio de Rx, a los efectos de cumplir y asegurar el protocolo). Se lo hace con toda la población de ratones de modo escalonado. También se trasladan las cajas de los animales que no serán irradiados, para que todos los animales tengan el mismo tipo de estrés por la acción del traslado. Las jaulas deben estar convenientemente identificadas, rotuladas y registradas, para que no haya confusión en el momento de las tomas de muestras posteriores en los animales. Una vez realizado el traslado e irradiación por jaulas, se retorna con las cajas y se las vuelve a depositar en sus sitios del bioterio de donde se los extrajo. Se controlan visualmente a los animales en sus cajas los días posteriores al proceso de irradiación.

6º Realizar la irradiación de los diferentes sublotes a las dosis previamente establecidas. Se realiza la irradiación de las cajas con sus dosis correspondientes. Antes de la irradiación de las cajas, se deben hacer ensayos previos de obtención de muestras de sangre por punciones en vena femoral o venas de las colas en cantidades entre 50 -75  $\mu\text{l}$  /vez y por ratón (tomando solo algunos por caja), de estas semanas de crecimiento y adaptación. Esto a los fines de probar las diferentes técnicas. Se aprovecha esta práctica además para establecer los rangos de valores normales para la cepa de ratones y para cada técnica de laboratorio usada. Además, para optimizar y acelerar el proceso de las muestras.

7º Tomar muestras de sangre en todos los animales de cada sublote. Exactamente a la semana siguiente de irradiados (Semanas 13-14 de vida según el Lote, respectivamente). Para ello es necesario comenzar muy temprano a tomar las muestras, una semana después de la irradiación con los RX. Así programado se realizan, animal por animal la obtención de sangre en forma aséptica y se van procesando según corresponda: los frotis (para medir la Fórmula Leucocitaria%), y muestras anticoaguladas de sangre para el Ensayo Cometa, para la medición del % Reticulocitos, y para obtener el número o Recuento de GB por unidad de volumen. Todos estos ensayos se hacen tanto para los no irradiados como para los irradiados con cantidades (dosis) crecientes de Rx, previamente controlados. La toma de muestras de sangre de todos los sublotes de irradiados y no irradiados son convenientemente rotulados. En resumen, desde el mismo día de obtención de muestras de sangre fresca, son procesadas inmediatamente para cada animal atendiendo de cuál jaula proceden. Luego los resultados se promedian por cada jaula, de acuerdo a cuál fue la dosis impartida. Las muestras del Ensayo Cometa, dado la cantidad de pasos y tiempo que lleva cada uno de ellos, demandan hasta los 2 a 3 días siguientes a la toma de muestra. Tiempo en el cual, si es necesario, se repiten algunas técnicas cuando hay suficiente sangre y si hay dudas sobre los resultados iniciales. Se descartan las muestras de sangre coaguladas y aquellas ya procesadas se guardan en freezer, para estudios genéticos posteriores.

8º Proceder a tomar muestras de sangre entre el momento de irradiación y las semanas siguientes antes del sacrificio. Estas otras tomas de muestras se hacen al azar

solo en algunos animales de cada uno de los diferentes sublotes. Esto es, para tratar de observar si hay una evolución (Clearence) o no de los datos de daños entre semanas para estas mismas técnicas en el conjunto de la población.

9° Proceder a sacrificar ordenadamente a todos los animales en la semana de vida 23 – 24. Es necesario preparar el instrumental quirúrgico, para obtener los órganos y tejidos con los cuales hacer los estudios histológicos (colon, tiroides y otros). Asimismo, para obtener una última toma de muestras de sangre por punción cardiaca de los ratones de cada sublote, irradiados con dosis crecientes y no irradiados (controles) como referencia. Reproducir las técnicas descriptas en sangre y registrar los resultados, para su posterior procesamiento estadístico.

10° Realizar los cálculos estadísticos de los datos. Resumir los datos obtenidos en los Lotes n° 1 y N° 2, en Tablas y en Graficas.

11° Procesar los datos teniendo en cuenta su identidad de acuerdo a su jaula de origen, Determinar de este modo, objetivamente, si existen o no diferencias estadísticamente significativas entre no irradiados e irradiados a dosis crecientes.

12° Proceder a hacer los cálculos de Sensibilidad y Especificidad y otros estadígrafos de relevancia como el Riesgo Relativo entre las poblaciones, de no irradiados e irradiados con distintas dosis crecientes.

#### **Protocolo llevado a cabo, para estudiar el efecto de la SBA sobre el MAV:**

1° y 2° Operar en forma similar al Protocolo antes descripto.

3° Ejecutar el experimento con SBAs, dividiendo sublotes a ser no expuestos y expuestos a cantidades de RX crecientes. A los fines de contar con una sustancia de referencia para la SBA a experimentar, se incluye otra de reconocida acción barredora de RL como en nuestro caso es la vitamina C (Sato et al, 2015). Se decide trabajar con solo las tres primeras cantidades de RX ya que solo se cuenta con 56 animales y necesitamos muchas alternativas distintas que analizar. La división se realizó de la siguiente manera, en irradiados a dosis crecientes de RX (D1, D2 y D3), en No irradiados o controles; en irradiados con dosis crecientes de RX+SBA (D1+ SBA, D2+ SBA y D3+ SBA); en irradiados con dosis crecientes de RX+ VitC (D1+ VitC, D2+ VitC y D3+ VitC); en no irradiados +SBAs; en no irradiados +agua ad libitum, rotulándolos adecuadamente. Se comenzó a proporcionarles ya sea Vitamina C o SBA según corresponda, desde una semana antes de irradiarlos hasta una semana después

4° a 11° Proceder en forma similar al Protocolo previo descripto antes.

**Procedimientos para la interpretación de la información. Análisis estadístico:** Para el análisis estadístico en cortes de tejidos histológicos, recuento de GB, formulas leucocitarias % se recopilándose datos por conteo de 200 células por muestra, y se evalúan las variaciones significativas de su número con una confianza mayor al 95% ( $P <0,05$ ). Se calculan los ANOVA, para determinar si hay variaciones significativas entre muestras no irradiadas e irradiadas. Haciéndose por lo general con el programa Excel dadas sus ventajas prácticas.

Para el análisis de resultados de %EC+ y del %Reticulocitos (o %EMN), se recopilaron datos por conteo de 100 a 400 células por cada muestra procesada y por portaobjeto respectivamente. Se evalúan así, las variaciones significativas con una confianza mayor al 95% ( $P <0,05$ ) en el daño del ADN. Se utiliza una prueba t independiente de una cola para comparar cada sublote irradiado, con el sublote no irradiado, y un ANOVA.

Las mismas pruebas estadísticas se usan para comparar las diferencias significativas en las variaciones del Peso Corporal animal, el recuento de Glóbulos Blancos, de la Formula Leucocitaria %, del % de Reticulocitos; del Índice de PMN/MN; del porcentaje de Ensayos Cometas positivos y del %EMN, bajo todas las condiciones experimentales (ratones no irradiados, ratones irradiados solamente, ratones no irradiados tratados y ratones irradiados y tratados con SBAs). Usándose hojas de cálculo con el programa Excel 2016®, se corroboran los resultados y procedimientos estadísticos bajo entorno Windows®, y se obtienen los cálculos estadísticos y graficas a partir de los datos experimentales.

El cálculo de especificidad y sensibilidad de %EC+ y del %EMN, se hizo con el auxilio del programa del sitio de internet con el OMNI® calculator (Zaborowska, 2020).

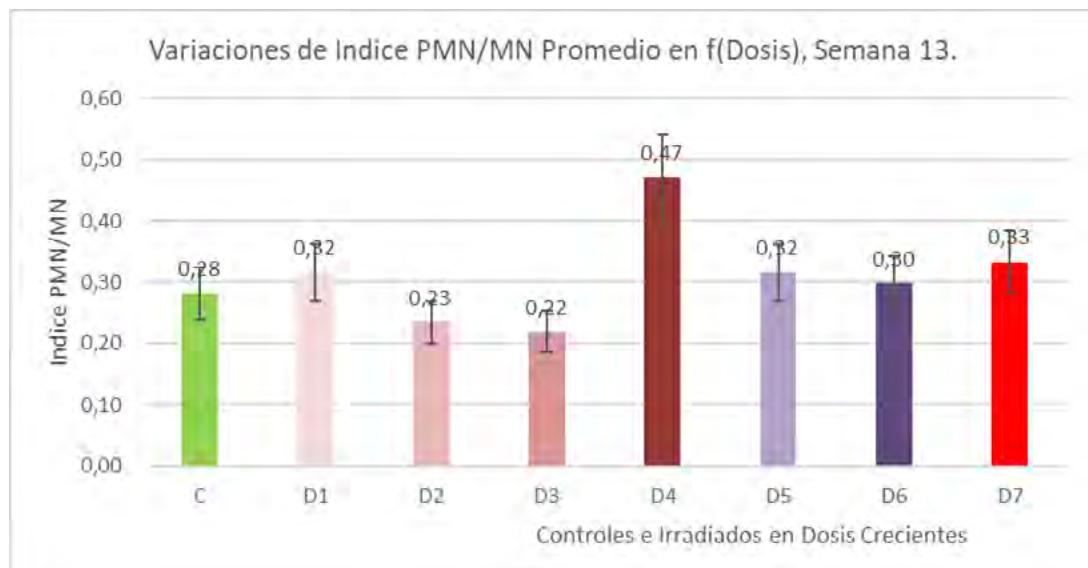
## Resultados

De los resultados obtenidos de los tres lotes de ratones podemos establecer, en base a las comparaciones hechas de los cortes histológicos de los no irradiados y los irradiados, que no se observaron diferencias significativas de las variables cito histológicas.

Respecto al peso corporal, el recuento de Glóbulos Blancos (GB) y la Formula Leucocitaria absoluta y relativa, se confirma la hipótesis que no hay variaciones estadísticamente significativas entre no irradiados e irradiados según estudios previos.

Los únicos ensayos que arrojaron resultados estadísticamente significativos fueron el Ensayo Cometa + (%EC+) y Ensayo de Micronúcleos (%MN) como se observa en las siguientes graficas. En figura 2, se representan el índice o cociente de polimorfos nucleares/micronúcleos, entre los diferentes cohortes. Del cálculo estadístico de Variancias de estos, resulta que el F calculado es > F tabulado, lo cual confirma la Hipótesis que hay variaciones estadísticamente significativas en el Índice PMN/MN entre no irradiados e irradiados, con una  $P < 0.01$  (Tabla 1). Siendo el cambio más significativo a exposiciones en D4 (100mSv).

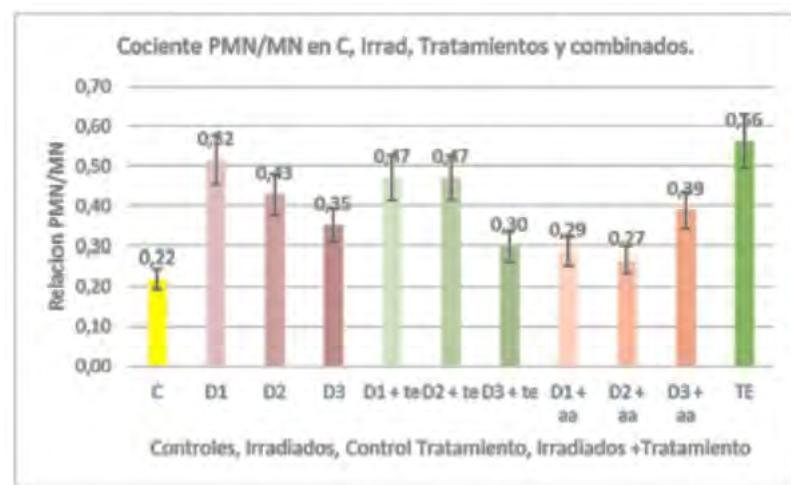
**Figura N°2.** Representación gráfica del Índice o cociente PMN/MN promedio, en no irradiados e irradiados del **Lote 1**, en semana 13.



**Tabla 1.** Calculo de Varianza y probabilidad de diferencias entre cohorte de irradiados y no irradiados.

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo				
RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1 (C)	3	23400	7800	1000000
Fila 2 (D1)	3	11900	3967	303333
Fila 3 (D2)	3	10300	3433	13333
Fila 4 (D3)	3	11200	3733	723333
Fila 5 (D4)	3	13000	4333	4723333
Fila 6 (D5)	3	12100	4033	763333
Fila 7 (D6)	3	14700	4900	1110000
Fila 8 (D7)	3	19600	6533	3523333
ANÁLISIS DE VARIANZA				
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F
Filas	49518333,3	7	7074047,62	4,724093
Columnas				
Error	20964166,7	14	1497440,48	
Total	73838333,3	23		
Probabilidad	Valor critico para F			
0,0065829	2,764199			

Respecto al lote 2, el índice de PMN/MN, en no irradiados e irradiados a la semana 13 de vida y 24 horas posteriores a la exposición no mostro diferencias significativa en los rangos de dosis administrados frente al control. Finalmente, el lote 3, mostro para el índice de PMN/MN diferencias significativas entre controles, y expuestos a 3 dosis y tasas de radiación (Valor p <0,01; Figura 3).

**Figura N°3.** Representación gráfica de los cocientes PMN/MN, para los distintos sublotes en la Semana 14 de vida en no irradiados, irradiados y tratados, del Lote 3.

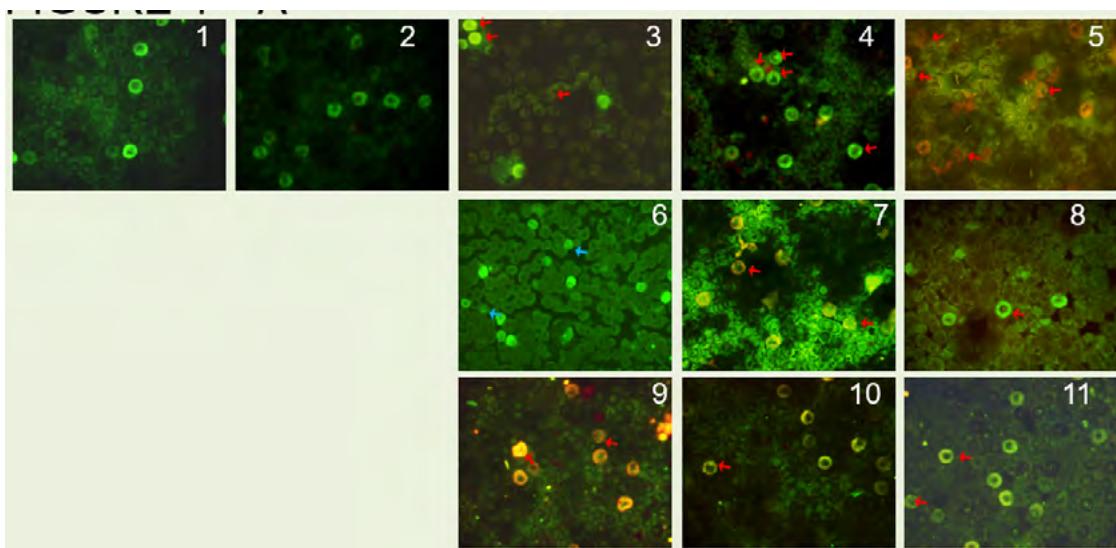
Aquí puede interpretarse que las RI, provocan un aumento del cociente PMN/MN con linfopenia. Pero, por otra parte, haciendo el cálculo estadístico del análisis de varianzas entre las distintas poblaciones, este índice no presenta diferencias estadísticamente significativas, en cuanto a los posibles efectos entre la SBA y la Vitamina C, en su función de radioprotectores.

Se debe tener en cuenta que la diferencia en este caso se deben al mayor número del recuento en polimorfosnucleares y asimismo, resultó elevado el porcentaje de reticulonocitos como se observan en la tabla 3. En la figura 4 y 5, igualmente se ilustra la presencia significativamente diferente de micronúcleos en frotis de lote 3 con el fin de evidenciar efectos de las sustancias bioactivas.

%Reticulocitos en C, D y T	Promedio (%Retic)	Desv Est (%Retic)
CTL	4,0	3
Solo Té	5,6	2
D3	6,4	3
D2	13,4	2
D1	19,9	10
D3 + Te	4,0	2
D2 + Te	6,6	5
D1 + Te	6,5	4
D3 + VitC	9,7	1
D2 + VitC	8,9	6
D1 + VitC	17,6	8

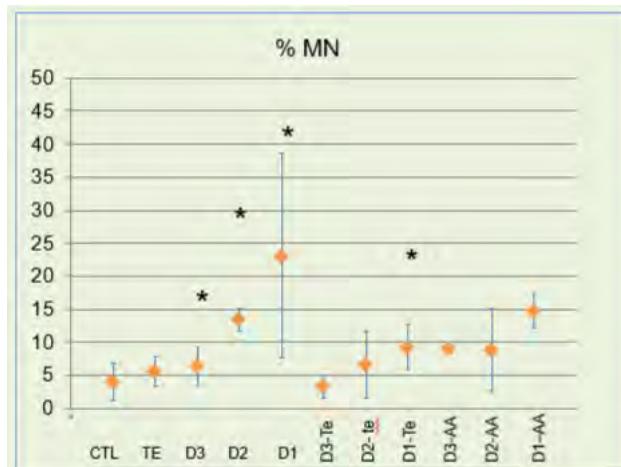
**TABLA 3.** Porcentaje de reticulonocitos en las diferentes cohortes del lote 3.

**Figura N°4.** Microfotografías de Frotis sanguíneos teñidos con Fluorocromo Naranja de Acridina, explicación en el texto más abajo.



En la Figura N°4 precedente, con microfotografías de %MN (de la **a** a la **k**) se tiñeron con Fluorocromos, donde se tienen las siguientes descripciones: (a) frotis de sangre periférica teñido con Naranja de Acridina donde muestra GR con restos nucleares señaladas con flechas. (a) Muestra control; (b) Dosis de muestra irradiada con RX D3 = 50 mSv; (c) muestra de ratón irradiado con RX D2= 25 mSv; (d) muestra de ratón irradiado con RX y D1 = 12 mSv; (e) muestra en tratamiento con té Essiac o SBA; (f) muestra de ratón irradiado con RX D3 + tratamiento con SBA; (g) muestra de ratones irradiado con RX D2 + tratamiento con SBA; (h) muestra de ratones irradiado con RX D1 + tratamiento

con SBA; (i) muestra de ratones irradiado con RX D3 + tratamiento con vitamina C; (j) muestra de ratones irradiado con RX D2+ tratamiento con vitamina C; (k) muestra de ratón irradiado con RX D1 + tratamiento con vitamina C.

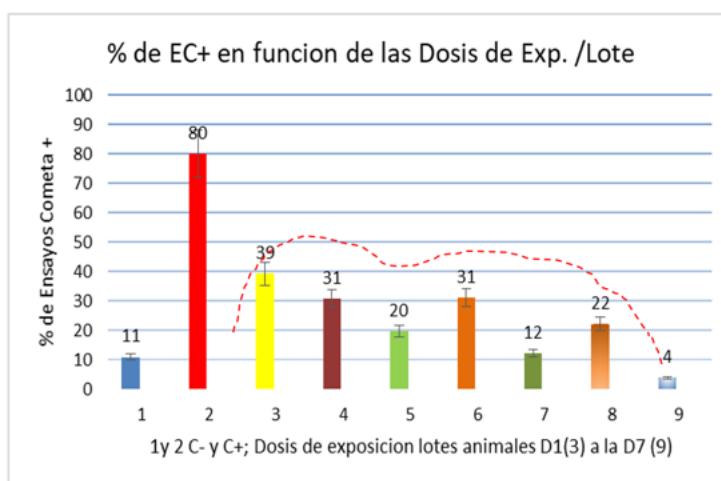


**Figura 5.** Diagrama de dispersión mostrando la distribución de porcentajes de micronúcleos en lote 3 y sus cohortes. \*: diferencias significativas, entre controles y dosis de irradiación, y entre D1 y D1 con consumo de te, y D3 y D3 con consumo de te.

Resultados obtenidos por ensayo cometa (porcentajes de colas de ADN)

Los resultados para ensayo cometa en lote 1 semana 14, luego de 24 horas de irradiados, las diferentes cohortes resultaron ser significativamente diferentes respecto del control (Valor  $p < 0.01$ ). El mismo ensayo en lote 2 resultó mostrar daño significativo con las dosis ensayadas para semana 13, a 24 horas de irradiados las cohortes irradiadas presentaron diferencia significativa respecto de los animales controles (Figura 6).

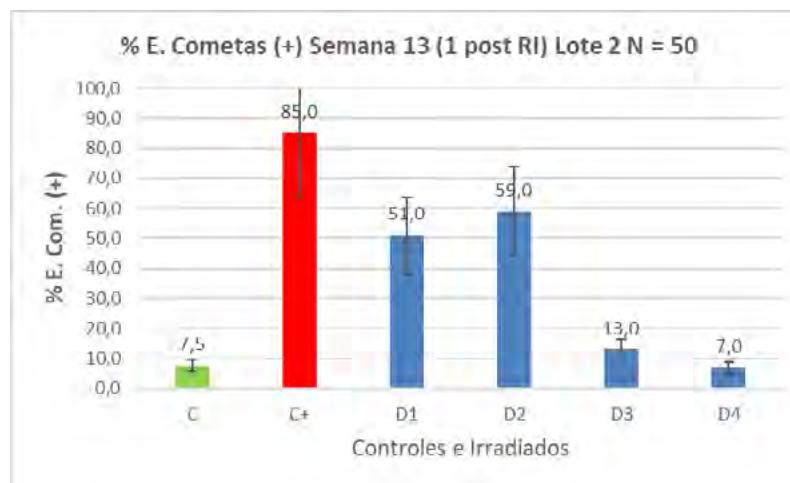
**Figura N°6.** Representación gráfica del %EC+ promedio en el Lote 1, en no irradiados (C) e irradiados (D1 a D7) en Semana 14. Se realiza un %EC control negativo y un %EC+ artificial para registros.



Del cálculo estadístico de Variancias de los %EC+, entre irradiados y no irradiados del Lote 1, resulta que el valor F calculado para las muestras es  $>$  a F tabulado, esto permite interpretar que hay diferencias estadísticamente significativas del %EC+, entre irradiados y no irradiados, con una  $P < 0.01$ . Presenta la dosis con mayor diferencia la D1, respecto a controles.

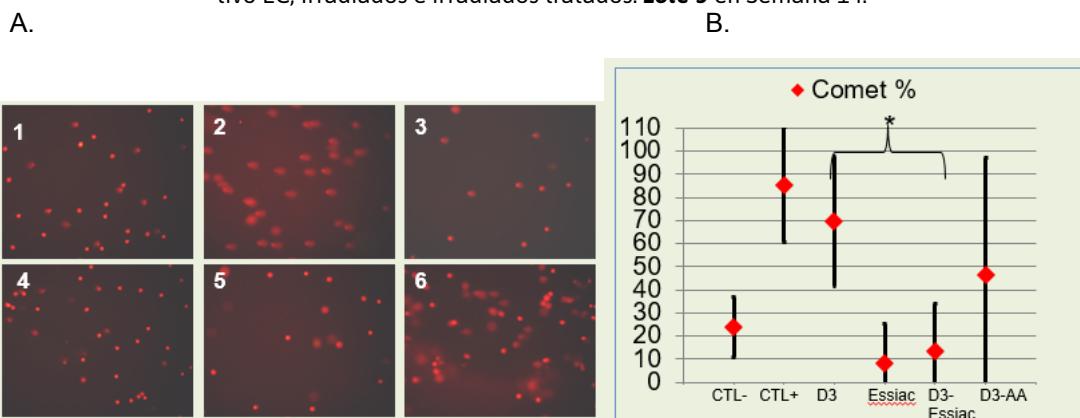
Para el lote 2, el ensayo cometa presenta asimismo daño genético en aquellas cohortes que recibieron radiación respecto de los animales controles (Figura 7). Del cálculo y análisis estadísticos de varianzas resulta que el F calculado es >> que el F tabulado, por lo cual se acepta la hipótesis que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los no irradiados e irradiados, para los %EC+ (1 semana posterior a la Irradiación), con un nivel de confianza >> 99,99%. Esto ocurre principalmente en las Dosis efectivas de exposición más bajas.

**Figura N°7.** Representación gráfica del %EC+ en no irradiados e irradiados del **Lote 2**, en Semana 13. Notar que se realizan controles negativos y controles positivos de %EC.



En figura 8 se ilustra las diferencias para el ensayo cometa en muestras irradiadas y tratadas con sustancias bioactivas, nuevamente el ensayo evidencia diferencias significativas entre controles e irradiados así como evidencia efecto radioprotector de las sustancias administradas. Haciendo el cálculo estadístico del análisis de varianzas entre las distintas poblaciones, se encuentra que el valor de F calculado es > al F tabulado, con una Probabilidad >> 99%, de lo cual surge que hay diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de %EC (+) entre no irradiados, irradiados con D3 y en irradiados con D3 + Tratamiento.

**Figura N° 8.** Representación gráfica de las Variaciones de %Ensayos Cometa en no irradiados (C neg.), Control positivo EC, Irradiados e irradiados tratados. **Lote 3** en Semana 14.



Ensayo del cometa: A – Microfotografías representativas de ensayo cometa (20xLeica DM500).(1) control negativo;(2) control positivo (30 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>);(3) Rayos X de 40 a 50 mSver; (4) Fórmula de té genuina de Essiac; (5) muestras expuestas bajo tratamiento con té Genuine Essiac; (6) muestras expuestas bajo tratamiento con ácido ascórbico (1 mg/por animal). B- Gráfico disperso con % medio del ensayo del cometa de ADN de la cola y distribución de desviación estándar.

### Sensibilidad y especificidad del MAV:

Entonces una vez realizado el cálculo con estos valores de %EC+, utilizando la página de internet de (Zaborowska, 2020), y promediando a ambos Lotes, donde se realizaron exposición a RX (en Dosis de manera ya descripta), tenemos en el lote 1 una Sensibilidad del 86,8% y una Especificidad del 91,7%. También vemos que con estos resultados promedio tenemos un valor de probabilidad positiva de 10,4. Un VPP de 72,2% y un VPN de 96,5%, con una exactitud del 88,0%. Mientras que en el lote 2 tuvimos una Sensibilidad del 75,7% y una Especificidad del 90,9%. Igualmente vemos que con estos resultados promedio tenemos un valor de probabilidad positiva de 8,3. Un VPP de 67,5% y un VPN de 93,3%, con una exactitud del % 79,1%. Tratando de interpretar el resultado del valor del coeficiente de probabilidad positiva, podemos afirmar que es unas 9 veces más probable observar daños por %EC+ al irradiar a bajas dosis y bajas tasas de dosis, que a no irradiar al modelo murino. Los valores altos como herramientas predictivas positivas y negativas también dan fuerza a esta prueba con estos modelos, para detectar daños genotoxicos por irradiaciones de lo que se infiere por las particularidades de los haces, son a relativas bajas energías, del orden de los 10 a 30 Kev aproximadamente, con un valor medio de 20 Kev.

Si bien estos valores hallados han resultado adecuados para las poblaciones estudiadas, la forma para mejorar aún más la Sensibilidad y Especificidad, del %EC+ como indicador de daño, radica en aumentar el número muestral de casos controles e irradiados, cuestión que calcularemos a continuación, fijando el Nivel de Confianza con el cual deseamos obtener datos (esto es en un 95,0%) y por lo tanto fijar un valor máximo de error relativo admisible (en un 5,0%), de acuerdo a que se observe el daño o no y en qué población (Controles y Dosis de RI), teniendo en cuenta que los valores de Desviación Estándar (DE%) de los resultados obtenidos hasta el momento con este método y con estas poblaciones, lo hemos calculado y tiene un valor de DE%. = 8,6 para el %EC (+), es decir ronda el ±9,0 %EC (+) en los resultados. Para ello procedemos a calcular cual sería el número de animales mínimo con los cuales realizar nuevos experimentos, con una menor incertezza.

Calculo del Número de muestras no, para el %EC+.

42 ratones, para cada Dosis o Control o Tratamiento sería suficiente para lograr datos con un nivel de Confianza del 95% o un error máximo relativo del 5% en las determinaciones.

Calculo de Sensibilidad y Especificidad, tomando como referencia los valores promedio de positividad en %Reticulocitos (o EMN) entre Controles e Irradiados en el Lote 1 y en el Lote 2.

Obtuvimos para el lote 1 una Sensibilidad del 85,3% y una Especificidad del 85,7%. También vemos que con estos resultados promedio tenemos un valor de probabilidad

positiva de casi 6,0. Un VPP de 59,9% y un VPN de 95,9%, con una exactitud del 85,0%. Mientras que en el lote 2 tuvimos una Sensibilidad del 76,3% y una Especificidad del 90,9%. Igualmente vemos que con estos resultados promedio tenemos un valor de probabilidad positiva de 8,4. Un VPP de 67,7% y un VPN de 93,9%, con una exactitud del % 79,5%. Tratando de interpretar el resultado del valor del coeficiente de probabilidad positiva, podemos afirmar que es unas 6 veces más probable observar daños en %Reticulocitos al irradiar a bajas dosis y bajas tasas de dosis, que a no irradiar al modelo murino. Los valores altos como herramientas predictivas positivas y negativas también dan fuerza a esta prueba con estos modelos, para detectar daños citogenéticos por irradiaciones.

## Conclusiones

Visto y considerando que se ha seguido en todas las experimentaciones de los diferentes lotes procesados, con un protocolo de irradiación, en el cual se ha procedido a mantener constantes toda una serie de parámetros, que van desde el funcionamiento y respuesta de la fuente de RX, lo cual nos permite asegurar que se han irradiado en valores de RI con un rango de incertezza también controlado, pasando por el tipo de animales, su cepa, y el control de mantenerlos en condiciones controladas de crecimiento hasta sus irradiaciones, las tomas de muestras y sus procesamientos hasta su sacrificio. Por otra parte, las semanas de vida en que se los irradia y se toman muestras, se han mantenido de un modo similar siempre en todos los experimentos. Al mismo tiempo se han obtenido en diferentes lotes, valores repetitivos en todos los rangos probados de RX, se puede afirmar que:

Mediante las técnicas de %EC+ y %Retic, se observaron daños mayores de ADN a menores dosis (aunque este resultado puede contradecir la lógica a esperar, de una relación lineal como por ej., que a mayor cantidad de agente dañino – mayor efecto observable). Esto puede explicarse, teniendo en cuenta que el daño ocurre en espesores del orden de magnitud del tamaño de una célula o incluso menor. Dado que los mamíferos están constituidos en un 60% por agua, y según evidencias experimentales el coeficiente mísico de atenuación del agua, donde si bien es una relación log-log, resulta que no presenta un valor constante del coeficiente de atenuación  $\mu$  del agua, cuando se trata de distancias del orden de los micrómetros. Este fenómeno, corroborado experimentalmente, produce la multiplicación del efecto de las RIs hasta unas 20 veces (Turner, 2004).

En las mediciones de magnitudes macroscópicas como ser, las variaciones del peso corporal de todos los lotes, los estudios morfológicos de tejidos con cortes histológicos, o formulas leucocitarias NO se han detectado variaciones estadísticamente significativas entre los no irradiados e irradiados. Esto es coherente con muchas publicaciones, donde se ven daños a corto plazo y con cantidades de RI relativamente altas y es menos probable observarlas a muy bajas dosis y tasas de dosis (Little et al, 2021).

Esto puede deberse seguramente a que no son observables a este nivel macroscópico los efectos de RI, ni en los rangos de tiempo que hemos fijado en estos animales para nuestro diseño experimental, ya que sobre todo en las dosis más bajas impartidas estamos muy dentro del rango de dosis relacionados con los efectos estocásticos. Por otra parte, teniendo en cuenta la escala temporal de expectativa de vida de una generación de esta cepa de ratones, la cual no supera las 60-70 semanas, resulta muy improbable poder detectar cambios en algún parámetro medido en tan poco tiempo y que implique transformaciones detectables celulares o en tejidos u órganos.

En los estudios realizados en sangre, por técnicas estandarizadas analizando diferentes parámetros hematológicos, se han obtenido resultados de alteraciones solo en algunas oportunidades, comparando entre animales irradiados respecto de los no irradiados. Es decir, no se han obtenido resultados constantes sino contradictorios, como la Neutropenia, o Linfopenia, a veces resultando valores elevados. El estudio del cociente de PMN/MN tampoco resulta confiable y fue tan variable como en los valores hematológicos. En pocas palabras, en estos relativos muy bajos niveles de exposición con dosis del rango estocástico, se observan resultados contradictorios o contrapuestos (Little et al 2021; Martínez Marignac et al, 2020). Estas observaciones, se pueden explicar, por la naturaleza azarosa de efectos con las dosis menores de todo el rango aplicado de RX y asimismo porque deben intervenir otros factores, que aún desconocemos.

Dado que se han demostrado daños estadísticamente significativos, en ADN de células circulantes, en animales adultos irradiados a bajas dosis y tasas de dosis, que los no irradiados, se concluye que las dos técnicas usadas (del %EC+ y del %Reticulocitos), se manifestaron como altamente sensibles y específicas. Para concluir, estos resultados nos permiten asegurar que hay fuerte evidencia que nos demuestra la validación de nuestro modelo animal para muy bajas dosis y tasas de dosis. La sensibilidad y especificidad reportadas para el presente modelo en ratones Balb/c, por medio de ensayo cometa y % reticulonocitos Por lo demás, tenemos que las técnicas de %EC+ y del %Reticulocitos /EMN, fueron aquellas con las cuales se obtuvieron resultados reiterados que implican medir daños en targets como el ADN que se repiten en todos los lotes. Sin embargo, se observó y midió mayor grado de daño de inducido ADN en las dosis más bajas, respecto de las dosis más altas en cantidad de RI este aspecto deberá ser estudiado bajo aspectos de efectos estocásticos, y by standard de las radiaciones ionizantes sobre seres vivos. Resultaron un poco mejores estos estadígrafos para los ensayos cometa que para % de reticulonocitos/MN.

Las asociaciones de ensayos de la medida en %EMN y %EC pueden considerarse como un buen par de técnicas confiables para determinar daños por RI reconocido ya por previos trabajos (Witt et al, 2008; Martínez et al, 2010; Sato et al, 2015). Hay antecedentes por diversos autores, quienes toman estos métodos como un indicador confiable para medir el daño genético inducido por RI nosotros validamos un modelo de estudio que permite su aplicación a estudios y determinantes de compuestos barredores de especies reactivas o radioprotectoras (Martínez Marignac et al, 2020).

Que la observación del daño para estos niveles de bajas dosis, si bien ha llegado a la escala subcelular, no quiere decir que los efectos se detengan a este nivel de estudio. Por lo contrario, se deja abierta una puerta muy importante a futuro, a estudios específicos del área de genética, donde puedan llegar a detectarse marcadores de expresión tumoral con técnicas de biología molecular y/o de mayor sensibilidad y especificidad aún.

**La «Validación» es un proceso que determina la idoneidad de una prueba que se ha desarrollado, optimizado y estandarizado adecuadamente para un/os objetivo/s determinado/s e incluye estimaciones de las características de rendimiento analítico y diagnóstico del ensayo o ensayos establecidos para ello. En el contexto de este escrito, una prueba que ha superado las tres primeras etapas (Especificidad y Sensibilidad Analítica; Especificidad y Sensibilidad Diagnóstica; y Repetitividad), incluida la caracterización de su rendimiento, puede considerarse como «validada para los propósitos iniciales esperados».**

De la discusión de los resultados experimentales, relacionados ahora con el lote 3, podemos destacar que:

Con el Lote 3 tampoco logramos evidencia estadísticamente significativa con variables macroscópicas, al analizarse las variaciones del peso corporal de todos los sublotes en función de semanas de vida, ni en los estudios morfológicos de tejidos con cortes histológicos. En este sentido no se han detectado variaciones entre no irradiados, no irradiados + tratamientos, irradiados ni irradiados + tratamientos.

El recuento de Glóbulos Blancos en ( $N^{\circ}/\mu l$ ) y su fórmula Leucocitaria % y otros indicadores hematimétricos que se realizaron antes y después de una semana post irradiación con RX (Semana 14 de vida), mostraron valores alternados de variaciones estadísticamente significativas y en otras oportunidades no. Los animales tratados con la SBA no mostraron variaciones estadísticamente significativas de la concentración de leucocitos en los animales irradiados con respecto a los que no se les suministro. Pero si se observaron variaciones estadísticamente significativas entre animales irradiados con distintas dosis efectivas.

La SBA, al ser administrada por vía oral *ad libitum* no causa un incremento significativo de %EMN+ o %EC+, lo que indica que su efecto es no tóxico a las concentraciones usadas y administradas en los ratones durante 28 días (desde dos semanas antes de la Irradiación, hasta dos semanas posteriores). Sin embargo, hubo una reducción estadísticamente significativa en la frecuencia de %EMN en las células tratadas con té Essiac en comparación con el ácido Ascórbico (30  $\mu g / kg / día$ ), así como una reducción estadísticamente significativa en el porcentaje de %EC+, por lo tanto, se puede afirmar que la té Essiac protege de manera eficiente y efectiva a las células contra la genotoxicidad inducida por RX a bajas dosis y bajas tasas de dosis. El mecanismo de radioprotección del té Essiac puede atribuirse a sus propiedades antioxidantes, antiperoxidativas lipídicas y captadoras de radicales libres (Martínez marignac et al, 2020).

La administración de la infusión de SBA, resultó sin efectos negativos manifiestos sobre la salud de los animales. Tampoco incidió en modo negativo en la salud de los animales que se administró, lo cual se ve reflejado en la evolución del peso corporal de los ratones y en sus valores Hematológicos, realizados de rutina en forma experimental. Se observa, que la cohorte total de animales no mostró diferencias de peso corporal significativas una semana después de la irradiación, hasta su sacrificio. Similares observaciones ya fueron hechas por otros autores. Asimismo, tampoco se demostraron efectos adversos en los ratones irradiados con administración de vitamina C (dosis administrada durante una semana antes de la Irradiación y una posterior como en otros reportes). Tanto la vitamina C como el té Essiac como SBA, se administraron *ad libitum* en el bebedero de agua.

Se han demostrado en el MAV, características radioprotectoras / radiomitigantes de la Sustancia Bioactiva suministrada, ante la incidencia de RIs en muy bajas dosis y tasas de dosis. Esta acción observada de las SBAs, (a ser demostradas en posteriores etapas de investigaciones clínicas), que pueden ser beneficiosas administrarlas preventivamente, no solo a los pacientes sobrevivientes de canceres sometidos a radioterapia, sino también a los trabajadores de áreas de radiodiagnóstico y radioterapia, como asimismo otros tipos de pacientes que deben someterse a estas tecnologías.

## Bibliografía

- Azzam EI, Jay-Gerin JP, PD. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letter.* (2012): p. 545-552.
- Berrington de González A, Mahesh M, Kim KP, Bhargavan M, Lewis R, Mettler F, Land C.(2009). Projected cancer risks from computed tomographic scans performed in the United States in 2007. *Arch Intern Med.* 2009 Dec 14;169(22):2071-7.
- Biedermann, K. A., Sun, J. R., Giaccia, A. J., Tosto, L. M., & Brown, J. M. (1991). scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 88(4), 1394–1397.
- Campbell EJ, Dachs GU. Current limitations of murine models in oncology for ascorbate research. *Front Oncol.* 2014;4:282.
- Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* 2017;58(5):235-263.
- Cheki M, Mihandoost E, Shirazi A, Mahmoudzadeh A. Prophylactic role of some plants and phytochemicals against radio-genotoxicity in human lymphocytes. *J Cancer Res Ther.* 2016 Oct-Dec;12(4):1234-1242.
- de Toledo SM, Buonanno M, Harris AL, Azzam EI. Genomic instability induced in distant progeny of bystander cells depends on the connexins expressed in the irradiated cells. *Int J Radiat Biol.* 2017 Oct;93(10):1182-1194. doi: 10.1080/09553002.2017.1334980. Epub 2017 Jun 15.
- Dobrzański L, Krzysztof W. Fornalski, y Ludwig E. Feinendegen (2015).Cancer Mortality Among People Living in Areas With Various Levels of Natural Background Radiation. *Dose Response.* 2015 Jul-Sep; 13(3): 1559325815592391.
- Feinendegen LE. Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. *Br J Radiol.* 2005;78(925):3-7.
- Goodwin S, McPherson J, McCombie R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics.* Volume 17. 2016;; p. 49-55.
- Grajewski B, Whelan EA, Lawson CC, Hein MJ, Waters MA, Anderson JL, MacDonald LA, Mertens CJ, Tseng CY, Cassinelli RT II, Luo L. "Miscarriage among flight attendants" *Epidemiology.* 2015;26(2):192–203.
- Hauptmann M, Daniels RD, Cardis E, et al. Epidemiological Studies of Low-Dose Ionizing Radiation and Cancer: Summary Bias Assessment and Meta-Analysis [published correction appears in *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2023 May 4;2023(61):e1. doi: 10.1093/jncimonographs/lgac027]. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2020;2020(56):188-200.
- Isubakova, D.S., Tsymbal, O.S., Bronikovskaya, E.V. et al. Methylation of Promoters of Apoptosis-Related Genes in Blood Lymphocytes of Workers Exposed to Occupational External Irradiation. *Bull Exp Biol Med* 171, 357–361 (2021).
- Jeggo P.A. PLH,CAM. DNA repair, genome stability and cancer: A historical perspective.. *Nat Rev Cancer* ;16. 2016;; p. 35-42.
- Khan HA, Ahmad MZ, Khan JA, Arshad MI. Crosstalk of liver immune cells and cell death mechanisms in different murine models of liver injury and its clinical relevance. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2017 Jun;16(3):245-256.
- Kitahara C.M. PDL,NG,LMP,DMM,SSL,ea. Occupational radiation exposure and thyroid cancer incidence in a cohort of U.S. radiologic technologists, 1983-2013. *Int. J. Cancer.* 2018, p. 2145-49.

- Leonard, S. S., Keil, D., Mehlman, T., Proper, S., Shi, X., & Harris, G. K. (2006). Essiac tea: scavenging of reactive oxygen species and effects on DNA damage. *Journal of ethnopharmacology*, 103(2), 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.013>
- Linet MS, Slovis TL, Miller DL, et al. Cancer risks associated with external radiation from diagnostic imaging procedures [published correction appears in CA Cancer J Clin. 2012 Jul-Aug;62(4):277]. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(2):75-100.
- Little MP, Azizova TV, Hamada N. Low- and moderate-dose non-cancer effects of ionizing radiation in directly exposed individuals, especially circulatory and ocular diseases: a review of the epidemiology. *Int J Radiat Biol.* 2021;97(6):782-803. doi:10.1080/09553002.2021.1876955.
- Little MP, Wakeford R, Kendall GM. Updated estimates of the proportion of childhood leukaemia incidence in Great Britain that may be caused by natural background ionising radiation. *J Radiol Prot.* 2009;29(4):467-482.
- Martínez, A., Coleman, M., Romero-Talamás, C. A., & Frías, S. (2010). An assessment of immediate DNA damage to occupationally exposed workers to low dose ionizing radiation by using the comet assay. *Rev Invest Clin*, 62(1), 23-30
- Martinez Marignac VL, Modragon Leonel, Favant Jose Luis. (2019). Sources of Ionizing Radiation and their Biological Effects: An Interdisciplinary View, from the Physics to Cell and Molecular Biology. Article. *Clinical Cancer Investigation Journal*, CCIJ: Volume 8. Issue 4. Page Nos. 129-175.
- Martinez Marignac Veronica L; Oertlin Gloria; Favant Jose Luis; Cervantes Lucia; Richard, Silvina. 154. Tumor protein p53 methylation is not involve in dna damage produced by low ionizing radiation doses (<0.5gy) in mice model; Reunión Conjunta SAIC SAB AAFE AACYTAL 2023; Revista Medicina Suppl.83, pp: 91; Lugar: Mar del Plata; Año: 2023.
- .Martinez Marignac Veronica L; Oertlin Gloria; Cervantes Lucia; Cantero Fernanda; De La Lama Fiorella; Favant Jose L. (2021) SURVEY OF X-RAY DAMAGE IN PERSONNEL OF PUBLIC HEALTH SERVICES IN ENTRE RIOS: DATA FOR LOW DOSE RADIATION. *Medicina Vol 81 Suppl III:* 245.
- Martinez Marignac VL, Modragon L., Oertlin G, Cervantes L, Cantero F., Favant JL. (2020). Preclinical Study of Genuine Essiac Formula: A Cancer Treatment Eight-herbs' Tea Minimizes DNA Insult of X-rays. *Clinical Cancer Investigation Journal -CCIJ*, 9(4):126-135.
- Memon A, Rogers I Paudyal P, Sundin J. Dental X-Rays and the Risk of Thyroid Cancer and Meningioma: A Systematic Review and Meta-analysis of Current Epidemiological Evidence. *Thyroid.* 2019 Oct 14. doi: 10.1089/thy.2019.0105.
- Miousse IR, Kristy R. Kutanzi, and I.Koturbash. (2017). Effects of Ionizing Radiation on DNA Methylation: From Experimental Biology to Clinical Applications. *Int J Radiat Biol.* 2017 May ; 93(5): 457-469.
- Moreira VB, Mattaraia VG, Moura AS. Lifetime reproductive efficiency of BALB/c mouse pairs after an environmental modification at 3 mating ages. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54(1):29-34.
- Morgan WF,&BWJ. Issues in low dose radiation biology: the controversy continues. A perspective. *Radiation Research*, 179. 2013;; p. 221-29.
- Nakamura H. , Pag.290-292 B. Brenner's Encyclopedia of Genetics. 2nd ed. Hughes SM&K, editor. London: Elsevier Inc.; 2013

- Nobuyuki HAMADA y Yuki FUJIMICHI. (2014) Classification of radiation effects for dose limitation purposes: history, current situation and future prospects. *Journal of Radiation Research*, 2014, 55, 629–640.
- Preston DL, Kitahara CM, Freedman DM, Sigurdson AJ, Simon SL, Little MP, Cahoon EK, Rajaraman P, Miller JS, Alexander BH, Doody MM, Linet MS. "Breast cancer risk and protracted low-to-moderate dose occupational radiation exposure in the US Radiologic Technologists Cohort, 1983–2008. *British Journal of Cancer*. 2016;115:1105. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.292>.
- Russu, I. Z., Bilko, D. I., & Bilko, N. M. (2023). HEMATOPOIETIC PROGENITORS CELLS IN PERIPHERAL BLOOD OF BALB/C MICE UNDER IONIZING RADIATION ACTION IN SUBLETHAL DOSE. *Problemy radiatsiinoi medytsyny ta radiobiologii*, 28, 216–224. <https://doi.org/10.33145/2304-8336-2023-28-216-224>
- Sato, T., Kinoshita, M., Yamamoto, T., Ito, M., Nishida, T., Takeuchi, M., Saitoh, D., Seki, S., & Mukai, Y. (2015). Treatment of irradiated mice with high-dose ascorbic acid reduced lethality. *PloS one*, 10(2), e0117020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117020>.
- Seo, M. Y., & Lee, S. M. (2002). Protective effect of low dose of ascorbic acid on hepatobiliary function in hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Journal of hepatology*, 36(1), 72–77. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(01\)00236-7](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(01)00236-7)
- Schiesti R. Mouse Models for Efficacy Testing of Agents against Radiation Carcinogenesis. Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2013 enero; 10(107-143).
- Tang, S. M., Deng, X. T., Zhou, J., Li, Q. P., Ge, X. X., & Miao, L. (2020). Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 121, 109604. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109604>.
- Turner JE. Atoms, Radiation and Radioprotection. Darmstadt, Germany: Wiley Verlag; 2004., 2<sup>a</sup> Ed.
- Vaiserman A, A.Koliada, O.Zabuga, y Y. Socol (2018). Health Impacts of Low-Dose Ionizing Radiation: Current Scientific Debates and Regulatory Issues. [Dose Response](#). 2018 Jul-Sep; 16(3): 1559325818796331.
- Vasquez M.Z. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: A practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. *Mutagenesis* 25. 2010;; p. 187-199.
- Williams JP, Stephen L. Brownb, George E. Georgesc, M et al. (2010). Animal Models for Medical Countermeasures to Radiation Exposure. *Radiat Res*. 2010 April ; 173(4): 557–578
- Witt K, Livanos E, Kissling G, TD, Caspary W, Raymond R. Tice R&RL. Comparison of Flow Cytometry and Microscopy-Based Methods for Measuring Micronucleated Reticulocyte Frequencies in Rodents Treated with Nongenotoxic and Genotoxic Chemicals. *Mutat Res*. 2008;; p. 550-566.
- Wong FL YMSHea. Noncancer disease incidence in the atomic bomb survivors: 1958–1986. *Radiat Research*. 1993; 135(418–430).
- Zaborowska Ł. <https://www.omnicalculator.com/statistics/sensitivity-and-specificity>. [Online]; 2020. Available from: <https://www.omnicalculator.com/statistics/sensitivity-and-specificity>

**PID6176**

**Denominación del Proyecto**

Validación de Modelo Murino en la acción de sustancias Bioactivas Scavengers, ante radiaciones ionizantes X

**Directora**

Cantero, María Fernanda. Favant, José Luis (baja por jubilación RES 254/20)

**Codirectora**

Martinez Marignac Verónica Lucrecia

**Unidad de Ejecución**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Dependencia**

Facultad de Ingeniería

**Contacto**

[fernandacantero@hotmail.com](mailto:fernandacantero@hotmail.com)

**Cátedra/s, área o disciplina científica**

Cátedra de Seguridad Biológica y Radiológica perteneciente al Departamento de Macrosistemas- FIUNER.

**Instituciones intervenientes públicas o privadas:**

Laboratorio Interdisciplinario de Biología y Genética Molecular (IBIOGEM), Centro de Investigaciones Científicas y de Transferencia Tecnológica a la Producción (CI-CYTTP), CONICET, Diamante, Entre Ríos.

**Integrantes del proyecto**

Internos: Integrante estudiante de grado: Spessotti, Ingrid Cecilia. Colaboradora: De La Lama, Fiorella. Becarios vinculados a PID: Cervantes Schamun, Lucia Gabriela; Vallmitjana, Eliana Gabriela

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**

01/02/2018 y 24/12/2021

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 249/24 (30-08-2024)