

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS

MAESTRIA EN FÍSICA APLICADA

DEPENDENCIA DEL DAÑO INDIRECTO AL ADN EN FUNCION DE LA
TEMPERATURA ESTUDIADO MEDIANTE METODOS MONTE CARLO
TRACK STRUCTURE

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Omar Rodrigo García García

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Eduardo Moreno Barbosa

Dr. José Ramos Méndez

PUEBLA, PUE.

Diciembre 2020

Resumen

En este trabajo se estudió la relación entre el daño indirecto al ADN en función de la temperatura a través de las herramientas computacionales que nos brinda la simulación Montecarlo Track Structure.

Para ello se utilizó y extendió el software TOPAS n-Bio basado en la paquetería Geometry and Tracking 4 (Geant4) desarrollado por el CERN en 1998 como un esfuerzo internacional para desarrollar una herramienta accesible para la simulación del transporte e interacción de radiación con la materia y que a lo largo de los años ha sido ampliado para cumplir los requerimientos de numerosas áreas de investigación, entre ella la física médica.

A lo largo de este trabajo se hizo una revisión de los fundamentos teóricos tanto la situación actual en cuanto a tratamientos contra el cáncer, específicamente aquellos que involucran a la radioterapia en combinación con la hipertermia y el efecto que esta última pueda tener en el tejido vivo para hacerlo más radiosensible. Por otra parte, se revisaron los fundamentos de la simulación computacional basada en Monte Carlo Track Structure y como se aplica para recrear el fenómeno de la radiólisis de un medio acuoso; tal y como el que existe en el ambiente celular, y de todas sus etapas, desde la interacción física de la radiación con el medio y la disociación que esta provoca, la dinámica molecular durante la etapa fisicoquímica entre las especies producidas y finalmente la etapa de química estable en la que los radicales sobrevivientes interactuaran con el material genético.

Posteriormente se extendió el software TOPAS-nBio basado en Geant4 para que el método IRT con el que se simula la etapa química de la radiólisis del agua tomara en cuenta a la temperatura del medio y modificara los parámetros controlan las reacciones químicas entre las especies radiolíticas siguiendo los modelos reportados en la literatura tanto para las tasas de reacción entre las especies químicas como para los coeficientes de difusión.

Finalmente desarrollamos una aplicación en TOPAS-nBio para contabilizar el daño indirecto al ADN en función de la temperatura haciendo uso de modelos computacionales de plásmidos pUC19 en una solución acuosa representativa del experimento con el que se compararon los resultados simulados.

Palabras clave: Física médica, radioterapia, daño indirecto al ADN, Hipertermia, métodos Montecarlo, simulación computacional.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres, Elsa García Balbuena y Alfonso García Lara, y a toda mi familia, quienes me ha apoyado incondicionalmente durante todo este trayecto y me han brindaron toda la ayuda y amor que he necesitado, a mi hermano Héctor, quien ha sido más que un compañero a lo largo de mi vida y ha estado ahí en los momentos más difíciles, no pude haber sido más afortunado ni más feliz que con ellos a mi lado.

A todos los amigos en cada rincón del mundo, quienes alegran mis días y me han brindado consejos y cariño en cada etapa, así como he contado yo con su apoyo siempre, quiero asegurarle a cada uno de ellos que puede contar conmigo cuando alguno me necesite.

Al amor en todas sus formas, manifestaciones e intensidades pues la vida se ha encargado de que nunca me faltara.

A los profesores de la facultad de ciencias físico matemáticas de la BUAP, y en específico aquellos que me instruyeron durante el posgrado, cuya sabiduría y enseñanzas he tratado de utilizar para cumplir mis metas cada día, su difícil labor no ha sido en vano.

A mi jurado, quienes también han gestado como mi comité tutorial y le han dado la forma final a este trabajo bajo el rigor que demanda la investigación científica.

A la UCSF y el LNS quienes brindaron los recursos computacionales para llevar a cabo este trabajo de investigación y a CONACIT por otorgarme la beca que me sostuvo económicamente estos arduos años de trabajo.

Por último, quiero agradecer sobre todo a mis asesores de Tesis, los Dres. Eduardo Moreno Barbosa y José Asunción Ramos Méndez, y a mi compañero de academia y amigo personal el M.C. Jorge Naoki Domínguez Kondo por su guía, paciencia y arduo esfuerzo a lo largo de este trabajo, que fue posible terminar solamente gracias a ellos.

Índice

1.	Capítulo 1: Introducción	2
	1.1. Cáncer: hechos globales.....	2
	1.2. Situación de México en cuanto al Cáncer	4
	1.3. Tratamientos Actuales con radioterapia	5
	1.4. Daño al ADN	6
	1.5. Reparación del ADN	8
	1.6. Hipertermia: efectos de la temperatura en el daño al ADN y los posibles mecanismos involucrados.	9
	1.7. Cuantificación del Incremento al daño celular mediante la hipertermia.....	10
	1.7.1. Aproximación macroscópica	10
	1.7.2. Aproximación mecánica microscópica	13
	1.7.3. Planteamiento del problema	14
2.	Capítulo 2 Marco Teórico	16
	2.1 Definiciones.....	16
	2.2 Fundamentos del Monte Carlo Track Structure.....	18
	2.2.1. Geant4 y TOPAS-nBio.....	22
	2.3 Bases teóricas: Radiólisis del agua	23
	2.4 Simulación del Transporte de Radiación a través del medio acuoso para la etapa física	24
	2.5 Método Independent Reactions Times (IRT)	25
	2.6 Modelos Químicos	27
3.	Capítulo 3 Metodología y Resultados	32
	3.1 Validación de los Modelos químicos	32
	3.2 Simulación con ADN	38
	3.3 Resultados para los rompimientos del ADN	41
4.	Capítulo 4 Discusión	46
	4.1 Resultados de la Implementación de los Modelos Químicos y Valores G.....	47
	4.2 Resultados para el daño indirecto al ADN	48
	4.3 Trabajo Futuro	49
	Bibliografía	50

DEPENDENCIA DEL DAÑO
INDIRECTO AL ADN EN FUNCION
DE LA TEMPERATURA ESTUDIADO
MEDIANTE METODOS MONTE
CARLO TRACK STRUCTURE

2020

Capítulo 1: Introducción.

1.1 Cáncer: hechos globales

El cáncer es uno de los problemas actuales más prominentes a los que se enfrentan los sistemas de salud pública. De acuerdo con la organización mundial de la salud, el cáncer es la segunda causa de mortalidad a nivel mundial, causando la defunción de 9.6 millones de personas al año (Imagen 1.1, datos del 2018). La tendencia de los casos indica que este problema se volverá más severo en las próximas décadas, alcanzando cifras de hasta 25 millones de muertes al año [World Health Organization Cancer Report 2014], siendo esta una razón para enfocar los esfuerzos necesarios para combatirlo. Se prevé que los países con bajos y medianos ingresos serán los más afectados, ya que “muchos de ellos no tienen los recursos, ni el equipo para hacer frente a esta escalada, en el número de personas con cáncer”. Esto hace aún más urgente el desarrollo de nuevas y mejores técnicas de diagnóstico y tratamiento con mayor accesibilidad para la población en general, y apremia a la investigación científica en este campo.

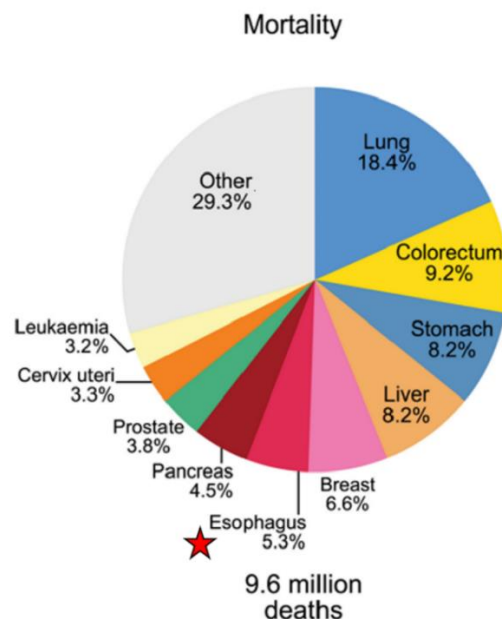


Imagen 1.1. Estadísticas sobre la mortalidad del cáncer (2018), imagen obtenida de: A Cancer Journal for Clinicians 2018;0:1-31. (2018) American Cancer Society.

Lo primero que debe ser entendido acerca del cáncer, es que se puede deberse a causas tan diversas como son: predisposición genética, agentes ambientales externos o incluso viral (como virus del papiloma humano). Existen también factores de riesgo que aumentan la probabilidad de que se desarrolle esta condición, tales como la mala alimentación, el consumo de sustancias nocivas como el alcohol y el tabaco, e inevitablemente la vejez. Sin embargo, todos los tipos de cáncer tienen una característica en común, son enfermedades genéticas que producen mutaciones en las células sanas alterando su comportamiento normal. Estas células *malignas* se reproducen a un ritmo descontrolado y pueden invadir tejidos y órganos adyacentes para expandirse posteriormente al resto del cuerpo. Este último proceso se conoce como metástasis, y es la mayor causa de muertes por cáncer. [World health organization, 2018, sección: Health topics/Cancer]

Las dificultades que se presentan al tratar estas enfermedades consisten, por una parte, en la resistencia que tiene este tipo de tejido a los mecanismos de defensa internos del cuerpo humano y a los medios terapéuticos externos, y por otra parte, a la facilidad en que puede expandirse por el cuerpo humano de manera agresiva. Esto es: el cáncer puede iniciar casi en cualquier parte del cuerpo humano. Normalmente las células crecen, se dividen y forman nuevas células que las remplazan a medida que estas envejecen, se dañan o mueran, al ritmo que el cuerpo las necesite. Sin embargo, cuando el cáncer se desarrolla, este proceso ordenado se interrumpe y las células dañadas que deberían morir se reproducen descontroladamente sin ser necesitadas. Estas células extra pueden producir *crecimientos* anormales llamados tumores, pero esto también depende del tipo de cáncer. Por ejemplo, la leucemia que es un tipo de cáncer en la sangre no produce tumores sólidos. Sin embargo, aquellos tumores que resulten ser malignos, pueden expandirse o invadir tejido sano cercano. A medida que crezcan, las células que los componen pueden desprenderse de ellos y viajar a rincones remotos del cuerpo a través del sistema circulatorio y el sistema linfático. Además, los cambios genéticos que experimentan las células mutadas no solo afectan su ritmo de reproducción, sino que hacen a la célula resistente a los mecanismos que deberían desactivarla o eliminarla a través del proceso de la apoptosis. Incluso estas células pueden evadir anticuerpos específicos, que, en condiciones normales, pueden eliminar a las células dañadas o malignas, pudiendo así “ocultarse” del sistema inmunológico. No solo eso, sino que un tumor puede influenciar su microambiente para que, por ejemplo, el tejido sano circundante forme vasos sanguíneos para así obtener nutrientes y oxígeno para seguir creciendo, y al mismo tiempo retirar los desechos producidos por el mismo tumor [National Cancer Institute, 2015, sección: What is cancer?]. Todo esto aunado al hecho de que hay zonas más vulnerables del cuerpo en las que el cáncer puede crecer de manera más agresiva; como en el páncreas o zonas en extremo peligrosas como el cerebro, hacen que combatir esta enfermedad sea todo un reto.

De acuerdo con la OMS, los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial son, en orden de incidencia (Imagen 1.2): de pulmón, de mama, colorrectal, de próstata, cáncer en la piel y de estómago. Sin embargo, también se estima que entre 30–50% de los casos de cáncer actuales pueden ser prevenidos evitando factores de riesgo, y mediante la implementación de estrategias de prevención. Hay que tomar en cuenta que muchos de los casos tienen una alta probabilidad de ser curados, si el diagnóstico se hace en una etapa temprana. Los factores de riesgo que deben ser evitados, según las

recomendaciones de este organismo internacional son: el uso del tabaco, el alcohol, una dieta desordenada y poca actividad física. Los anteriores, son cuatro de los factores con más riesgo en todo el mundo. Por otra parte, existen infecciones crónicas que pueden llevar al desarrollo de cáncer, como el *Helicobacter pylori*, papiloma humano y diversos tipos de hepatitis. Estas infecciones afectan de manera desproporcionada a países en vías de desarrollo. Aunado a esto, están la contaminación urbana del aire y el humo proveniente de la quema de combustibles. A pesar de que estas recomendaciones suenan del todo sensatas, el estilo de vida moderno y la desigualdad económica, hacen que el cumplimiento de evitar factores de riesgo sea difícil, especialmente para sectores vulnerables de la población.

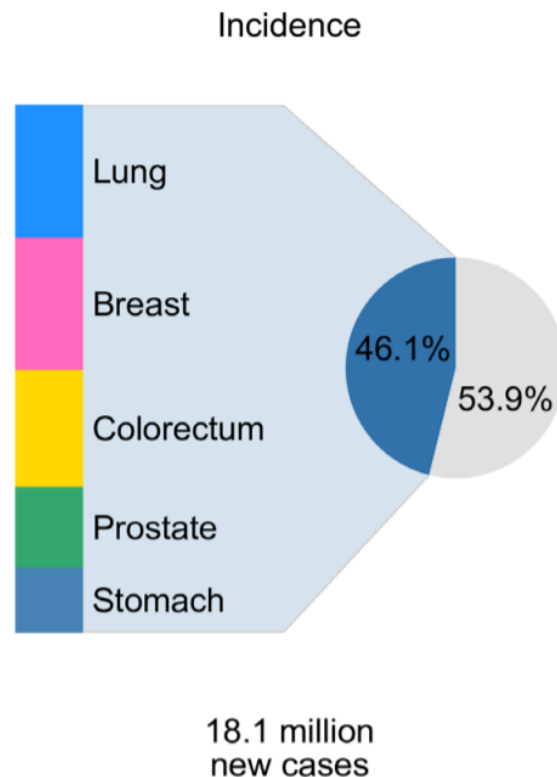


Imagen 1.2 Estadísticas sobre la incidencia del cáncer (2018) con los 5 tipos más comunes ocupando el 46.1% de todos los casos. Imagen obtenida de: The Global Cancer Burden in 2018 IARC CUTTING EDGE SESSION II: MEASURING TO CONTROL: HARNESSING LOCAL DATA FOR GLOBAL CANCER ACTION

1.2 Situación de México en cuanto al Cáncer

La situación en México, que cae en la categoría de país en vías de desarrollo, no es prometedora. En palabras del reporte “Mortalidad por cáncer en México 2000-2010: el recuento de los daños” por Aldaco Sarvide F., et al (2012).: “...vivimos una transición epidemiológica que está impactando

y presionando a los sistemas de salud del país”. Este reporte basado en datos del INEGI del año 2007, sitúa al cáncer como la segunda causa de muerte en el país, solo por debajo de la diabetes y por encima de las enfermedades isquémicas del corazón. Además se menciona: **“En México, la primera causa de muerte en mujeres entre los 30 a 59 años de edad es el cáncer mientras que entre los 15 y 29 años es la segunda causa. En los hombres de 30 años y mayores, los tumores malignos son la tercera causa de muerte”** Lo que indica que la mayoría de la población está en riesgo de desarrollar esta enfermedad en algún momento de su vida. El reporte menciona además: **“En el año 2010 fallecieron (todas las causas) un total de 592 018 personas en el país, de las cuales 74 685 fueron por cáncer, lo que equivale al 12.6 del total de eventos. En el año 2000 se reportan 437 667 fallecimientos, de los cuales 57 784 fueron por cáncer, lo que representó el 13.2% del total. Entre los años 2000 a 2010 de acuerdo a datos del INEGI, fallecieron por cáncer en el país un total de 726 554 personas.”** Lo anterior, corresponde solamente a los datos de la década pasada (Imagen 1.3), pero todos los indicadores nos llevan a que la situación actual es mucho más alarmante.

Hombres		Mujeres	
Tipo cáncer	Porcentaje (%)	Tipo cáncer	Porcentaje (%)
Próstata	15	Mama	13.3
Pulmón	12	CaCu	10.4
Estómago	8.1	Hígado y VB	7.3
Hígado y VB	7	Estómago	6.8
Colorrectal	5.8	Pulmón	5.1

Imagen 1.3 Principales tipos de cáncer en México por género. Imagen obtenida de: Mortalidad por cáncer en México 2000-2010: el recuento de los daños por Fernando Aldaco-Sarvide, Perla Pérez-Pérez et al (2012)

El reporte hace hincapié en el hecho del por qué estos datos están desactualizados: **“Lamentablemente, en México una de las grandes limitantes a la que se enfrentan los profesionales de la salud del área oncológica es la falta de información actualizada y accesible de forma fácil y sencilla, en donde se pueda revisar y conocer el número de casos nuevos y mortalidad por cáncer. El último registro disponible para la comunidad oncológica data del año 2003, por lo que nos enfrentamos a casi una década de oscuridad.”** Lo que nos hace suponer con mucha frustración, que las cosas no han mejorado desde el último reporte a la fecha en esta materia.

1.3 Tratamientos Actuales con radioterapia

En la actualidad existen numerosos tratamientos contra el cáncer. Sin embargo, el más apropiado para cada paciente depende del tipo de tumor y la etapa en que se encuentra. Algunos pacientes solamente

se tendrán que someter a un tratamiento, pero la mayoría tendrá que pasar por una combinación de ellos. [National Cancer Institute, 2015, sección: What is cancer?]

La radioterapia es utilizada en aproximadamente en el 50% de los casos de pacientes de cáncer. La radioterapia se lleva a cabo por medio de la liberación de radiación ionizante al tejido tumoral. La radiación es un agente físico que puede dañar a las células malignas y sanas al depositar su energía y formar partículas eléctricamente cargadas conocidas como iones. Estos iones pueden interactuar con el material genético de la célula y causar rompimientos en el ADN contenido en el núcleo celular, que puede resultar en la muerte de la célula. De esta manera se acorta la capacidad que un tumor para crecer y proliferar. La radiación se puede utilizar con la intención de curar o como medio paliativo. Además, puede ser usada en combinación con otros tratamientos como la quimioterapia, que es el uso clínico de fármacos para tratar el cáncer, principalmente metastatizado (fuera del tumor original), la cirugía o la inmunoterapia. En la inmunoterapia, se pondera el mismo sistema inmune del paciente para tratar el cáncer. Cuando la radioterapia se usa antes de una cirugía (terapia neoadyuvante), se hace con la intención de reducir al tumor, y si utiliza después de la cirugía (terapia adyuvante) se hará con la finalidad de destruir a las células y los tumores microscópicos que pudieran haber permanecido. Existen dos modalidades de radioterapia: la teleterapia y la braquiterapia. La teleterapia ocupa haces de radiación originados desde el exterior del cuerpo, dirigidos hacia la región del tumor. Este es el método más usado clínicamente. Por otra parte, la braquiterapia consiste en introducir material radioactivo dentro del tumor a través de catéteres o “semillas”. Esta opción se ocupa principalmente para uso ginecológico o para tratar cáncer de próstata [Baskar, R., Lee, K. A, et al. 2012].

Si bien la radioterapia se ha convertido en una parte integral de los tratamientos modernos en muchos tipos de cáncer, también está asociada a un riesgo de efectos secundarios a largo plazo. Esto se debe, a la toxicidad inducida al tejido sano, que es irradiado inevitablemente al liberar la mayor cantidad de radiación a la región tumoral. Reducir los riesgos de efectos secundarios es un área activa de investigación que involucra optimización matemática, física de radiaciones ionizantes, radiobiología y otras tecnologías. Entender los efectos de la radiación ionizante sobre el tejido biológico es un paso esencial para desarrollar nuevas técnicas de tratamiento, protocolos y dispositivos tecnológicos [Kaur P., Hurwitz M. D. et al. 2011].

1.4 Daño al ADN por radiación ionizante.

Es importante señalar que el daño provocado al ADN consiste de una larga cadena de sucesos que incluyen procesos biológicos. Las consecuencias pueden tardar días, o hasta años en desarrollarse. En esta sección se revisa el daño al ADN inducido por la interacción de radiación ionizante. Este proceso, puede ser muy corto, ya que los procesos físicos de interacción entre la radiación y el medio celular se da en una escala temporal de femtosegundos (10^{-15} s). [McMahon S. & Prise K. (2019)]. En esta sección, se hará una revisión general de los factores que pueden contribuir al daño del material

genético, específicamente aquellos mecanismos que pueden ser utilizados para tratar el cáncer y en específico aquellos que tengan una naturaleza físico-química.

Incluso antes del descubrimiento de la verdadera estructura del ADN, el material genético se identificó como la parte sensible de las células que podía ser dañada por la radiación. En particular, se ha mostrado que los rompimientos dobles (DBS) en el ADN, causados por rompimientos simples (SSB) en ambas hebras del material genético en una proximidad de entre 10 a 20 bases pares (bp)¹ están correlacionados fuertemente con la mortalidad celular [McMahon S. & Prise K. 2019]. Aunque el ADN celular tiene una amplia gama de mecanismos de reparación y contramedidas al daño, los rompimientos dobles son más difíciles de reparar o irreparables comparados con los rompimientos simples (rompimientos en una sola hebra de ADN) [McMahon S. & Prise K. 2019].

El daño al ADN puede ser caracterizado en dos clases dependiendo de su origen: endógena y exógena. El daño endógeno se da principalmente por la actividad química interna del ADN. Este contempla tanto los errores que pueden ocurrir en la síntesis, replicación o reparación del material genético y es debido a desequilibrios en el medio celular, que finalmente comprometen la integridad del mismo, generando mutaciones y defectos irreparables. Este tipo de daño se presenta sobre todo cuando se involucran reacciones hidrolíticas y oxidantes entre el medio acuoso celular y especies de oxígeno reactivas (ROS). Las ROS son usualmente productos secundarios de la cadena de transporte de electrones (ETC) durante el proceso de la respiración celular. A niveles normales, estas especies no son dañinas, de hecho, ayudan a ciertos procesos celulares e incluso forman parte del sistema inmunológico. Sin embargo, en grandes cantidades pueden producir diferentes tipos de lesiones al ADN. Su acción está relacionada con el desarrollo de enfermedades tales como Alzheimer, Parkinson, diabetes, insuficiencia cardíaca y en particular al cáncer. De entre las ROS destacan los *radicales superóxidos* ($\bullet O_2^-$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y en particular el radical hidroxilo ($\bullet OH$). Éste último es el más reactivo y por consiguiente el más peligroso, ya que puede dañar lípidos, proteínas y directamente al ADN a través de numerosos mecanismos de reacción. [Chatterjee N., Walker G.C. 2017].

Por otra parte, el daño exógeno se debe a factores externos a la célula. Estos factores pueden incluir compuestos químicos nocivos como las aminas aromáticas o los hidrocarburos aromáticos cíclicos producidas por humo de tabaco, pesticidas, quema de carbón o combustible. Otros factores, a los que estamos expuestos todo el tiempo, incluyen ciertos alimentos, o los agentes alquilantes utilizados para la quimioterapia en ambientes controlados. [Chatterjee N., Walker G.C. 2017].

La radiación ionizante utilizada en radioterapia engloba a numerosos tipos de partículas, como son: partículas alfa, beta, gamma y rayos X, neutrones, protones y iones de carbono. Estas partículas son aceleradas o producidas de tal manera que cuentan con suficiente energía como para arrancar electrones del medio (ionización) que atraviesan. Existen también fuentes naturales de este tipo de radiación (radiación de fondo) que están en contacto directo con los organismos vivos, y que generan daño constante a nuestro material genético, por ejemplo, el radón de subsuelo y la radiación de

¹ Aproximadamente 4 nm – 8 nm de longitud o dos vueltas o menos en la doble hélice

Hiroshima y Nagasaki. Cuando se usa de manera controlada, la radiación sirve en el ambiente médico para dar tratamientos oncológicos y es justamente la fuente de daño celular que nos interesa investigar [Chatterjee N., Walker G.C. (2017)].

Cada tipo de radiación se puede clasificar mediante la cantidad de energía que transmiten al medio. Una cantidad que cuantifica a la calidad de radiación es la transferencia lineal de energía (LET por sus siglas en inglés), cuyas unidades están dadas en $keV/\mu m$. Dependiendo de la densidad de ionización que transmite al medio, la radiación se puede clasificar como de alta LET (como la radiación alfa e iones de carbono) o de baja LET (como la radiación beta o gama). Además, el daño biológico está relacionado con la LET.

El daño al ADN por radiación se clasifica en directo e indirecto. El daño directo se refiere a la transferencia de energía de partículas cargadas directamente al ADN y que produce rompimientos potencialmente letales. El daño indirecto, se produce por cúmulos de especies químicas altamente reactivas (ROS, mencionadas en la sección anterior), producidas por el proceso de radiolisis del medio acuoso celular. La radiólisis es la disociación de moléculas en especies químicas y radicales libres debido a la interacción de la radiación ionizante [Desouky O., Ding N., Zhou G., 2015]. Como ya se ha mencionado el radical hidroxilo es el más peligroso para el ADN, y de hecho, el daño provocado por este representa el 75% del daño total provocado por radiación de baja LET [Vignard J. et al 2013]

1.5 Reparación del ADN

A pesar de que en este trabajo no abordará la modelación de los mecanismos de reparación del material genético dañado por radiación, se mencionarán brevemente algunos modelos que forman parte fundamental del estudio radiobiológico.

Si bien durante la radioterapia el daño al ADN empieza por las interacciones físicas, estas desencadenan una larga lista de procesos. Los organismos vivos han desarrollado muchos mecanismos de reparación del ADN. Entonces, aunque la radiación provoque en promedio 30-40 rompimientos dobles en una célula por unidad de dosis depositada (en unidades Gy), estos rompimientos solo representan un solo evento que puede ser letal. Es por eso que la mayoría de la mortalidad celular se da cuando estos mecanismos de reparación fallan o se da una reparación errada, que a la larga pueda implicar anomalías en los cromosomas [McMahon S. & Prise K. 2019].

Los mecanismos de reparación del ADN pueden entrar en funcionamiento en distintas etapas del ciclo celular. Se activan mediante diferentes estímulos y dependen del tipo de lesión que se deba reparar. En el caso de lesiones no letales como el daño a bases (BD), SSB o rompimientos de una sola hebra complejos (SSB+), se pueden activar mecanismos de reparación de lesiones no letales como la reparación por escisión de base (BER). En este mecanismo, parches pequeños y largos (SP y LP por sus siglas en inglés) son aplicados a las lesiones. En la mayoría de las lesiones en las que se dan lesiones reparadas por SP, interviene el remplazo de nucleótido único (single-nucleotide replacement). Cuando existen cúmulos de lesiones que debe ser reparados por un parche largo, interviene el mecanismo de reparación por escisión de Nucleótido (NER), que es el principal mecanismo por el que se reparan las lesiones causadas por radiación UV y por radicales libres en las células de los mamíferos [Ju-Ying Tsai, Fang-Hsin Chen et al. 2015]. El desarrollo y descripción detallada de los modelos de reparación rebasa el interés de este trabajo de tesis. Sin embargo, los parámetros iniciales (DSB, SSB) de esos modelos puede ser calculado con el Método de Monte Carlo, que será revisado en este trabajo de tesis. Para una revisión completa sobre los modelos de reparación nos podemos referir, por ejemplo, al artículo de Nimrat Chatterjee & Graham C. Walker del 2017: Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis.

En general, todo ser viviente está en constante contacto con agentes dañinos que pueden alterar el ADN en nuestras células, por lo que ellas cuentan con mecanismos de reparación robustos, estos son al mismo tiempo fundamentales para el correcto funcionamiento de las células sanas e irónicamente un obstáculo que hace más resilientes a las células cancerígenas al combatirlos. Para poder dar tratamientos más efectivos, es necesario entenderlos a fondo y como se verá más adelante su desactivación es una de las rutas más prometedoras para mejorar los tratamientos oncológicos.

1.6 Hipertermia: efectos de la temperatura en el daño al ADN y los posibles mecanismos involucrados.

La hipertermia, en el contexto oncológico, se define según Niloy R. Datta & Stephan Bodis (2019), como el incremento local o regional del tejido afectado (tumor) en un rango de temperatura de 39°C a 45°C para inducir radiosensibilidad, es decir, incrementar la efectividad del daño por radiación. [Oei, A. L., Vriend, L. E., et al. 2015].

El calor es un agente mutágeno que afecta múltiples componentes, estructuras y procesos de la célula a distintas escalas; altera directamente la estructura física de algunas componentes celulares, daña directamente proteínas y a la membrana celular. Además, interfiere con los ciclos celulares y puede activar procesos que llevan a la apoptosis, que es la muerte celular *programada* o provocada por el mismo organismo [Oei, A. L., Vriend, L. E., et al. 2015]. El metabolismo proteínico también es

afectando, alterando la estabilidad y el ensamblaje de complejos macromoleculares esenciales para la replicación celular [Kaur P., Hurwitz M. D. et al. 2011].

Sin embargo, la discusión de si el aumento en la temperatura es suficiente para generar daño directo es un tema que sigue en debate. Algunos estudios tempranos indicaron que la hipertermia inducía rompimientos directos en el ADN y aberraciones en los cromosomas debido a la desnaturalización de proteínas o interfiriendo con la replicación [Oei, A. L., Vriend, L. E., et al. 2015]. Es por eso que se ha optado por la combinación de tratamientos ya validados, como la radioterapia o la quimioterapia. La hipertermia es un radio sensibilizador potente de las células cancerígenas, así como un potenciador favorable para los compuestos quimioterapéuticos. También a temperaturas entre 40.5°C y 42.5°C, se mejora la entrega de oxígeno a las células cancerígenas que necesitan de un ambiente hipóxico como parte de las condiciones óptimas para su desarrollo [Datta, N. R., & Bodis, S. 2019].

La forma en la que la hipertermia induce la radio sensibilización ha sido atribuida principalmente a la desactivación de los mecanismos de reparación con los que las células cancerígenas cuentan. La acción de la hipertermia en el ADN, afecta en múltiples puntos a los mecanismos de reparación. El daño por radiación, específicamente SSB y DSB, puede resultar en tres tipos de lesión según intervenga la reparación del material genético: subletal, potencialmente letal y letal. Sin embargo, la hipertermia puede desactivar ciertas enzimas clave que inhiben así los mecanismos de reparación. A pesar de que la forma exacta en la que la hipertermia afecta a la reparación del ADN no sea conocida a fondo, los resultados son claros en cuanto a que el aumento de la temperatura influye en la supervivencia celular. [Datta, N. R., & Bodis, S. 2019].

1.7 Cuantificación del incremento al daño celular por la combinación hipertermia-radioterapia.

1.7.1 Aproximación macroscópica.

Uno de los modelos utilizados para cuantificar el daño generado por la radiación en el tejido vivo es el modelo lineal cuadrático (L-Q). El modelo L-Q está basado en la proporción que existe entre dos componentes, una lineal (α , en unidades Gy^{-1}) que delimita la pendiente inicial de la curva de supervivencia celular (imagen 1.4) y está directamente relacionada con las lesiones simples en el material genético, y una cuadrática (β en unidades Gy^{-2}). Mediante estas componentes, se define el denominado factor de sensibilidad α/β , que es ampliamente utilizado en la práctica para el diseño de programas de planificación de dosis en tratamientos clínicos con radioterapia [Datta, N. R., & Bodis, S. 2019].

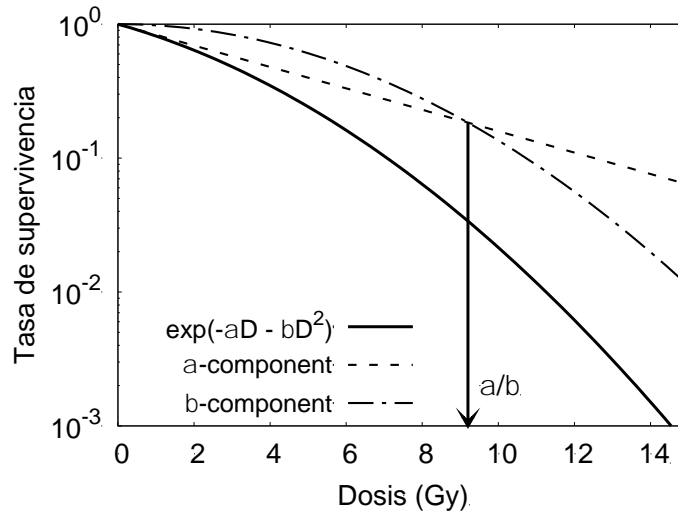


Imagen 1.4. Curva de supervivencia celular para células V79 irradiadas con rayos-X. Los parámetros α y β se obtuvieron de Furosawa et al (2000). En la imagen, se muestran las componentes lineal (punteada) y cuadrática (líneas y puntos) del modelo L-Q (líneas sólidas). El factor α/β es el valor de dosis en el que ambas componentes son iguales.

Mediante el uso del modelo L-Q, se puede obtener un valor cuantitativo del cambio en la radio sensibilidad bajo condiciones de hipertermia. En el trabajo de Niloy R. Datta & Stephan Bodis de 2019 “Hyperthermia with radiotherapy reduces tumour alpha/beta: Insights from trials of thermoradiotherapy vs radiotherapy alone. Radiotherapy and oncology”, se llevó a cabo un estudio utilizando cultivos de células cancerígenas de Cérvix (SiHa) en el que se reportó que existe una reducción en el valor de α/β de 13.8 Gy a temperatura ambiente hasta 3.3 Gy a 41°C. Es decir, de aproximadamente un 76%, lo que representa un incremento del coeficiente β en 3.9 veces su valor original. Cabe mencionar que, a 43°C, el decremento en el mismo valor es menor, concretamente de 8.7 Gy. En el mismo artículo se menciona que esto se debe a que ambas componentes, α y β , aumentan respecto esta temperatura, pero la componente cuadrática tiene mayor peso. Como resultado de esto, 41°C se determinó como la temperatura ideal para conseguir la mayor tasa de mortalidad celular. La interpretación de los resultados recae en la inactivación de los mecanismos de reparación del ADN [Datta, N. R., & Bodis, S. 2019].

Niloy R. Datta & Stephan Bodis (2019) realizaron una compilación de estudios radioterapéuticos clínicos (meta estudio), con pacientes de cáncer en cervix, mama, cuello y cabeza. Se dividieron los resultados con y sin hipertermia con el fin de encontrar una diferencia entre los valores de la razón α/β en ambos tratamientos. La cantidad denominada *Dosis Biológicamente Efectiva* fue calculada (BED por sus siglas en inglés) mediante:

$$BED = n d \left[1 - \frac{d}{(\alpha/\beta)} \right]$$

Donde n es el número total de fracciones dadas y d es la dosis por fracción, el estudio se realizó de tal manera que las dosis por fracción y el número total de fracciones fuera el mismo para los pacientes de ambos grupos con el fin de que la única variable entre el tratamiento con y sin hipertermia fuera el valor de α/β . El artículo presenta de manera detallada como se consideró y comparo la información de los diferentes estudios clínicos utilizando como herramienta el “Comprehensive Meta-analysis Software package” (versión 3.0). Con este análisis se llegó a la conclusión siguiente “*la radioterapia combinada con hipertermia es claramente una mejor opción en el tratamiento*”. El daño biológico efectivo promedio (reportado en Gy) para cada uno de los tratamientos se puede resumir en la siguiente tabla:

Tipo de cáncer	Radioterapia (Gy)	Radioterapia con hipertermia (Gy)
Cáncer de mama	47.2	89.2
Cáncer de cuello y cabeza	79.1	141.9
Cáncer de cérvix	59.9	84.2

Tabla 1.1. Aumento en el daño biológico a diferentes tipos de cancer, datos obtenidos de: Niloy R. Datta & Stephan Bodis (2019) Hyperthermia with radiotherapy reduces tumour alpha/beta: Insights from trials of thermoradiotherapy vs radiotherapy alone

Sin embargo, ya que las cantidades presentadas en la tabla 1.1 son promedios, se debe tomar en cuenta el error en estas mediciones. Por ejemplo, en el estudio mencionado en el artículo referente al cáncer de cérvix, se midió un daño biológico efectivo entre 48 a 72 Gy sin hipertermia y otro de 61.7 a 98.5 Gy con hipertermia, lo que se podría interpretar como que la combinación de tratamientos no es siempre efectiva.

1.7.2 Aproximación Mecánica Microscópica

Otra forma de cuantificar el daño al material genético es por medio del número de rompimientos que se dan en la cadena de ADN después de una irradiación. Los rompimientos SSB y DSB son una medida cuantitativa microscópica que se correlaciona directamente con la probabilidad de supervivencia celular.

De acuerdo al trabajo de U. Klimczak et al, “Irradiation of Plasmid and Phage DNA in Water—alcohol Mixtures: Strand Breaks and Lethal Damage as a Function of Scavenger Concentration” de 1993: “Rompimientos simples (SSB) y dobles (DSB) de hebra en ADN suspendido en un medio acuoso se producen durante su irradiación con rayos gamma a través de distintos mecanismos, principalmente por la acción de los radicales $\bullet\text{OH}$ generados por la radiólisis del agua que rodea al material genético. En menor medida, estos son generados por el efecto directo de la radiación. La cantidad de DSB's que se forman pueden seguir una tendencia lineal o cuadrática respecto a la dosis de irradiación, cuyos mecanismos deben ser considerados de manera independiente.”

El efecto que tiene la hipertermia en la mortalidad celular puede ser explicado entonces desde una perspectiva físico-química microscópica: la temperatura afecta la movilidad de las moléculas disueltas en un medio acuoso y las tasas de reacciones entre ellas. Esto aplica directamente a los radicales libres generados por la radiólisis. Como se discutió en la sección 1.4, el principal responsable de estos rompimientos es el radical hidroxilo, entonces los efectos que la temperatura tiene sobre la dinámica molecular de este radical no pueden ser ignorados al analizar los mecanismos por los que el ADN sufre lesiones. [Tomita et al. 1995]

En el trabajo de Hiroyuki Tomita et al, de 1995: “Strand Break Formation in Plasmid DNA Irradiated in Aqueous Solution: Effect of Medium Temperature and Hydroxyl Radical Scavenger Concentration” se midieron los efectos que la temperatura tenía en “el ataque del radical $\bullet\text{OH}$ al ADN en la fase líquida del agua.” Para ello, se irradiaron con plásmidos de ADN tipo pBR322; que son pequeños lazos de material genético extracelular de 4363 bases pares de longitud y un peso molecular de aproximadamente 2.8×10^6 dalton. Tomita utilizó una solución acuosa en su estudio conformada por una combinación de TRIS-EDTA (también conocida como tampón TEA o TE solution en inglés, donde TRIS es el nombre abreviado del compuesto orgánico trishidroximetilaminometano y EDTA del ácido etilendiaminotetraacético, ambos solventes usados en experimentos de biología molecular) con una concentración de $29.75 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de material genético. Los plásmidos fueron introducidos en tubos de polipropileno con una capacidad de $500 \mu\text{g}$, después fueron irradiados con rayos gama de una fuente de cobalto 60 a diferentes dosis: 6, 12.5, 25, 50 y 100 Gy en un ambiente aerobio. Se estudió un rango de temperaturas de -20°C hasta los 42°C . Los tubos fueron preparados en baños térmicos correspondientes a tales temperaturas. Los rompimientos simples y dobles se muestran en la figura 1.4. Como se observa, a partir de 20°C existe un incremento en SSB y DSB.

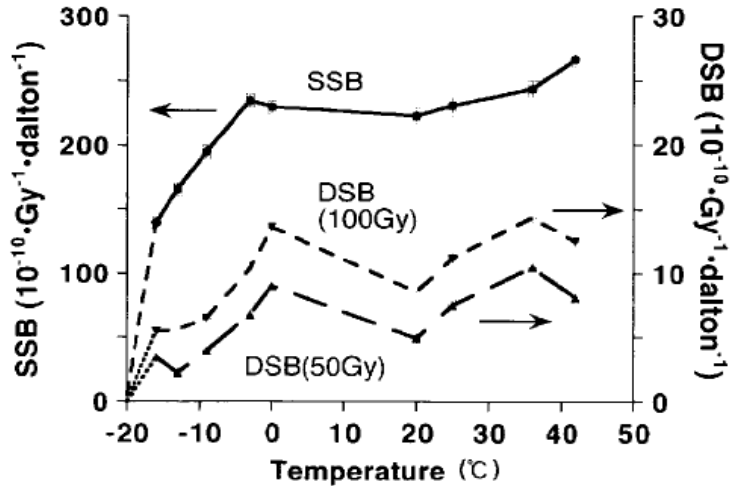


Imagen 1.4. Rompimientos simples (SSB) y dobles (DSB) en función de la temperatura, imagen obtenida de H. Tomita et al. 1995 Strand Break Formation in Plasmid DNA Irradiated in Aqueous Solution.

1.7.3 Planteamiento del problema.

El estudio de daño al ADN utilizando plásmidos en lugar de células reduce los procesos existentes en el ambiente celular que son demasiado complejos. Un plásmido suspendido en una solución acuosa (generalmente bien caracterizada) presenta un sistema conveniente para el modelado mecánico de los efectos de diversas reacciones físico-químicas con el ADN, agregando a esta razón que existe un método denominado electroforesis en gel, con el cual se pueden separar los fragmentos de ADN por tamaño lo que permite clasificarlas por tipos de lesión.

El trabajo experimental de Tomita et al., (figura 1.4) es el único del que se tiene registro sobre rompimientos de ADN en función de la temperatura para baja LET. Utilizaremos el trabajo de Tomita et al., para temperaturas mayores a 20°C, relevantes para hipertermia (sección 1.6), como trasfondo y marco de referencia para describir cuantitativamente el daño indirecto al ADN en función de la temperatura y a partir de ellas recrear las condiciones experimentales de dicho trabajo en las simulaciones computacionales que desarrollaremos, intentando tomar en cuenta la mayor cantidad de aspectos que pudieran influir en los resultados con el fin de que nuestras simulaciones sean lo más fidedignas posibles.

En este trabajo de tesis, se desarrollarán las herramientas computacionales que permitirán el estudio mecánico del daño al ADN por radiación ionizante a temperatura variable. Esto permitirá cuantificar e interpretar la contribución físico-química inducida por radiación del efecto de la hipertermia en radioterapia desde primeros principios.

Capítulo 2: Marco Teórico

Los métodos computacionales son una herramienta poderosa que ha sido utilizada durante décadas para la resolución de problemas tan complejos cuya solución analítica es difícil de obtener. Por ejemplo, los mecanismos fundamentales sobre los que se sostiene este trabajo de tesis: el transporte de radiación a través de la materia y la dinámica molecular que existe dentro de un medio para describir el movimiento de las especies químicas resultado de la radiólisis.

Si bien, los métodos para simular procesos físico-químicos en función de la temperatura presentados en esta tesis se han incluido en códigos computacionales en el pasado, su desarrollo se remonta a los años 90 [Green N. J. B., Pilling M. J. et al (1989)]. Estos métodos se han refinado a lo largo de los años y al momento, son herramientas esenciales para la investigación en radiobiología [Plante I. (2017)]. Sin embargo, los códigos computacionales desarrollados (Plante I. & Devroye L 2017, Tomita H. 1995) son en su mayoría de acceso restringido, lo que reduce naturalmente el número de personas que puede trabajar con ellos y en consecuencia se limita la capacidad de desarrollar aplicaciones y expandir el código y nutrirlo reduciendo su potencial. El objetivo general de esta tesis, es implementar y verificar algoritmos para la cuantificación mecánica del daño al ADN en un TOPAS-nBio [Schuemann et al 2019] desarrollado bajo la filosofía de código abierto, con el fin de que los algoritmos implementados en este trabajo, estén disponibles a la comunidad científica. Se modelará mecánicamente por primera vez la reacción OH con ADN a varias temperaturas bajo radiación de baja LET.

2.1 Definiciones

Al hablar del transporte de radiación a través de la materia en radioterapia y de los fenómenos que de éste devienen, es conveniente definir desde el principio, conceptos y unidades claves para entender los fenómenos y cantidades que se manejan en esta línea de investigación. Empezando desde un concepto elemental de radiación ionizante, que se puede entender como “todas aquellas partículas con suficiente energía para causar ionizaciones en el medio que atraviesan” [Nikjoo H., Uehara S, & Emfietzoglou D. (2012)]

Podemos empezar con el concepto de fluencia, que es el cociente entre el número de partículas dN atravesando la sección transversal de una esfera con área da [ICRU85a (2011)]:

$$\Phi = \frac{dN}{da} \quad (1)$$

Después podemos definir el flujo \dot{N} , como el cambio en el número de partículas que se emiten, transmiten o reciben en una región espacial bien delimitada, respecto al tiempo [ICRU85a (2011)]:

$$\dot{N} = \frac{dN}{dt} \quad (2)$$

Para estas cantidades se considera un área esférica, ya que es la manera más sencilla al hecho de que se debe tomar en cuenta un área perpendicular a todas las posibles direcciones de las partículas consideradas. Si además se toma en cuenta el cambio de esta cantidad respecto al tiempo se obtiene la tasa de fluencia:

$$\dot{\Phi} = \frac{d\Phi}{dt} = \frac{d^2N}{dadt} \quad (3)$$

Otra cantidad de importancia en radioterapia es la “dosis absorbida” [ICRU85a (2011)]:

$$D = \frac{d\bar{\epsilon}}{dm} \quad (4)$$

Donde $d\bar{\epsilon}$ es la energía promedio impartida por radiación ionizante a una porción de materia con masa dm . Esta cantidad tiene unidades de J/kg, que se define como gray (Gy) [ICRU85a (2011)].

Otro concepto importante que se debe discutir en esta sección es la transferencia lineal de energía o LET (por sus siglas en inglés) L_{Δ} . Esta se define como la cantidad de energía promedio perdida dE_{Δ} debido solamente a interacciones electrónicas con el medio, por unidad de longitud dl , dejando de lado la suma de la energía cinética promedio de los electrones producidos por las partículas cargadas incidentes mayores a Δ [ICRU85a (2011)]:

$$L_{\Delta} = \frac{dE_{\Delta}}{dl} \quad (5)$$

La interpretación física de esta cantidad es la siguiente. La LET es la densidad de ionizaciones que se dan en el medio. En radiobiología, el daño biológico por radiación puede cuantificarse por la efectividad biológica relativa (RBE por sus siglas en inglés), definida como el cociente entre la efectividad biológica provocada por un tipo de radiación relativa a otra de referencia, a condición de que se deposite la misma cantidad de energía [ICRP 2007] y correlacionada con la LET. La LET

ofrece una mejor aproximación que la dosis (energía absorbida por unidad de masa) para relacionar el daño biológico. Esto se muestra de manera esquemáticamente en la figura 2.1, en donde se muestra que la misma dosis depositada por dos tipos diferentes de radiación puede inducir un daño biológico diferente. Una partícula con mayor LET dejará una densidad mayor de ionizaciones a su paso (más compactas) que una de baja LET, debido a esto inducirá DSB más compactos y difíciles de reparar y resultará en un daño biológico mayor.

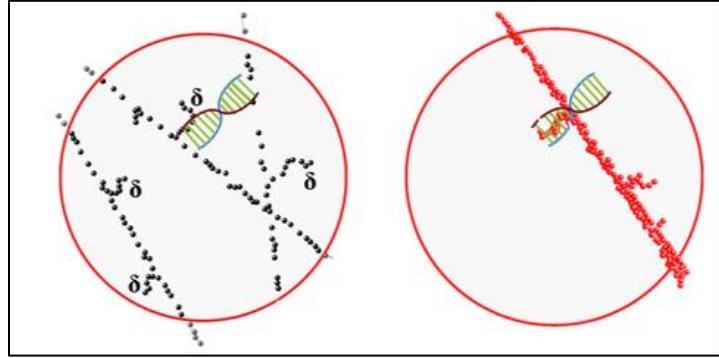


Figura 2.1. Se muestra el esquema de fuentes de irradiación que depositan la misma cantidad de dosis en una región de interés, pero con diferente calidad de haz. La imagen de la izquierda representa una irradiación con baja LET. La imagen de la derecha representa una irradiación con alta LET. Imagen recuperada de: Monte Carlo track-structure simulations of DNA damage part I: direct damage. José Ramos-Méndez (2019) 2nd summer school of Medical Physics

2.2 Fundamentos del Monte Carlo *Track structure*

Entre las aplicaciones más importantes de los métodos computacionales basados en el muestreo de números aleatorios, está la simulación del transporte de radiación a través de la materia. El transporte de radiación ionizante a través de la materia es un proceso complejo, en el que los múltiples mecanismos involucrados son estocásticos y regidos por distribuciones de probabilidad. Esto hace a los métodos Monte Carlo una herramienta ideal para recrearlos, además de que la complejidad de las ecuaciones requeridas hace que una solución analítica sea extremadamente difícil de obtener. En particular, la ecuación de Transporte de Boltzmann debe ser resuelta para encontrar una solución exacta al problema del transporte de partículas [Andreo P., Burns D.T. et al (2017)].

$$\frac{1}{v} \frac{\partial}{\partial t} \phi(E, \vec{r}, \vec{\Omega}, t) + \vec{\Omega} \cdot \nabla \phi(E, \vec{r}, \vec{\Omega}, t) + \phi(E, \vec{r}, \vec{\Omega}, t) \Sigma_{tot}(E, \vec{r}) - \int_0^{\infty} dE' \int_{4\pi} \phi(E', \vec{r}, \vec{\Omega}', t) \Sigma_s(E \rightarrow E', \vec{\Omega} \rightarrow \vec{\Omega}') d\vec{\Omega}' - s(E, \vec{r}, \vec{\Omega}, t) = 0 \quad (6)$$

En esta ecuación, v es la velocidad de las partículas, $\phi(E, \vec{r}, \vec{\Omega}, t)$ es la fluencia de las partículas al tiempo t , con energía E , en la posición \vec{r} y en dirección $\vec{\Omega}$, $\Sigma_{tot}(E, \vec{r})$ es la probabilidad por unidad de longitud de que una de las partículas interactúe con el medio y $\Sigma_s(E \rightarrow E', \vec{\Omega} \rightarrow \vec{\Omega}')$ es la probabilidad por unidad de longitud de que una partícula con energía y dirección $(E, \vec{\Omega})$ produzca una interacción en la posición \vec{r} , una partícula secundaria con parámetros $(E', \vec{\Omega}')$ y $s(E, \vec{r}, \vec{\Omega}, t)$ es el número esperado de partículas producidas por una interacción por unidad de tiempo. Sin embargo, incluso en medios infinitos uniformes la solución para esta ecuación es sumamente compleja, volviéndose imposible cuando se consideran geometrías más complejas y medios discontinuos no uniformes [Andreo P., Burns D.T. et al (2017)].

Si bien esta claro que el transporte de radiación por MC es una aproximación fidedigna al fenómeno real, este sigue siendo una aproximación que sigue reglas dentro de un paradigma bien establecido:

Se considera que las partículas tienen trayectorias determinadas bien definidas y que las interacciones o colisiones con el medio son tratadas en términos de distribuciones de probabilidad y no en términos de un tratamiento mecánico cuántico (como interferencia o screening), por lo que efectos de interferencia y de colisiones múltiples son descartados. La probabilidad de que se dé una interacción del tipo j en un segmento ds de la trayectoria está íntimamente relacionada a la sección eficaz microscópica σ_j para esa interacción.

$$P_j = N\sigma_j ds \quad (7)$$

Donde N es el número de centros de dispersión por unidad de volumen, que a su vez están repartidos en el medio siguiendo una distribución aleatoria regida por la densidad del material. La sección eficaz es una cantidad que caracteriza tanto la probabilidad de interacción de la radiación con el medio como los efectos que esta interacción tienen sobre la radiación.

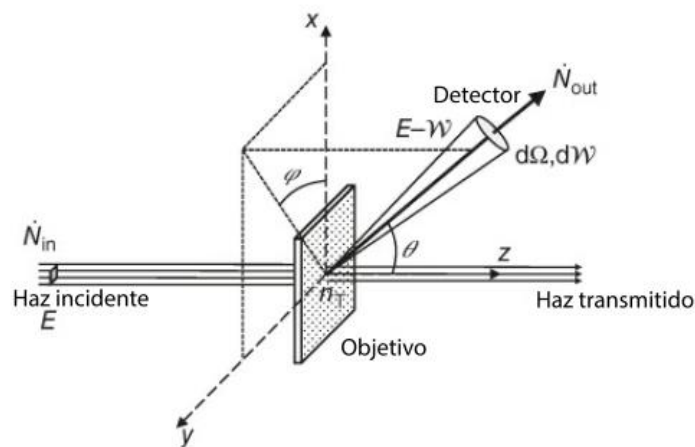


Figura 2.2 esquema de la sección eficaz para cierto tipo de interacción, imagen obtenida de: Fundamentals of Ionizing Radiation Dosimetry (2017) por Andreo P., Burns D.T. et al

Considere un flujo de \dot{N}_{in} partículas con energía inicial E pasa a través de un objetivo con n_T “átomos” que lo conforman, la cantidad \dot{N}_{out} de partículas que perdieron cierta cantidad de energía W (es decir tienen $E - W$ energía final) detectadas en cierta dirección (θ, φ) sobre un ángulo sólido diferencial $d\Omega$ dividida sobre la cantidad de partículas iniciales definen a la sección eficaz para cierta interacción con el medio. En otras palabras, es probabilidad de detectar a una partícula en cierta dirección (θ, φ) después de que se dé una interacción con el medio.

Las secciones eficaces $\sigma(E)$ se representan matemáticamente como funciones de densidad de probabilidad, específicas para cada tipo de interacción que se puede dar entre la radiación y el medio. Estas determinan la energía perdida por las partículas incidentes, las partículas secundarias que pueden ser generadas durante estas interacciones y la dispersión que experimentan después de cada interacción. Ya que una partícula puede interactuar a través de diversos procesos (por ejemplo, ionización, excitación y dispersión elástica) la sección eficaz microscópica total está dada por la suma de las secciones eficaces individuales para cada interacción:

$$\sigma_{tot}(E) = \sum_j \sigma_j(E) \quad (8)$$

Al considerar que el número total de átomos por unidad de masa N de un elemento con masa atómica A está dado por:

$$N = N_a/A \quad (9)$$

Entonces la sección eficaz total macroscópica, que se puede entender como el número total de centros de dispersión en un material por unidad de masa y está dada por:

$$\Sigma_{tot} = \sigma_{tot}(E) \frac{N_a}{A} \quad (10)$$

Una cantidad macroscópica conocida como el “coeficiente de atenuación lineal” $\mu(E)$ está íntimamente relacionado a esta cantidad y con la densidad del medio ρ de la siguiente manera:

$$\mu(E) = \frac{\rho}{A} N_a \sigma_{tot}(E) \quad (11)$$

La distancia promedio que viaja una partícula entre interacciones está dada por el llamado “camino libre medio” $\langle s \rangle = \lambda$, y también está íntimamente relacionada con el coeficiente de atenuación lineal y, por consiguiente, con la sección eficaz total del medio:

$$\langle s \rangle = \lambda = \frac{1}{\mu(E)} = \frac{A}{\rho N_a \sigma_{tot}(E)} \quad (12)$$

Las trayectorias de las partículas se construyen a partir de segmentos finitos en los que experimenta un “camino libre” durante el cual su energía y su momento no cambian, este solo se ve interrumpido hasta que se da una interacción súbita con el medio, el tamaño de dicho segmento está dado en términos del camino libre medio (ecuación 12).

Cabe mencionar que a estas escalas de energía las propiedades del material no cambian con la irradiación, ya que el efecto que tiene la interacción de la radiación con la materia es despreciable (no existe daño mecánico o calentamiento del medio) por lo que este tipo de efectos es despreciable.

En la figura 2.3 se detalla esquemáticamente el proceso de simulación Monte Carlo utilizando la ecuación (12). Siguiendo un proceso iterativo, la simulación comienza con una partícula inicial con un estado muestreado estocásticamente $p_1(\vec{x}_{(1,0)}, \vec{u}_{(1,0)}, E_{(1,0)})$ en la que \vec{x} , \vec{u} y E denotan su posición, momento y energía más probable. Al interactuar con el medio en la posición $\vec{x}_{(1,0)}$ la partícula depositara cierta cantidad de energía, cambiara su momento y avanzara una distancia $\lambda_{(1,1)}$ que se determinan siguiendo las funciones de probabilidad correspondientes al tipo de interacción que se da con el medio (por ejemplo la ecuación 12), dejando a la partícula en un nuevo estado $p_1(\vec{x}_{(1,1)}, \vec{u}_{(1,1)}, E_{(1,1)})$, algunos tipos de interacción pueden resultar en la creación de partículas secundarias p_2 que se transportaran independientemente, pero seguirán formando parte de la misma historia, las partículas se transportaran iterativamente, repitiendo estos pasos hasta que pierdan suficiente energía o salgan del volumen de interés.

Detalles de la modelación del transporte de radiación.

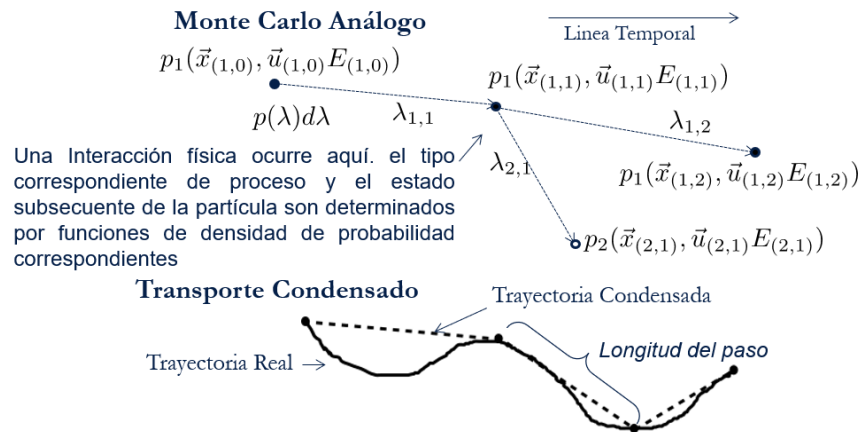


Figura 2.3. Esquema de la modelación del transporte de radiación: análogo (track-structure) y condensado. Imagen obtenida de: Monte Carlo track-structure simulations of DNA damage part I: direct damage. José Ramos-Méndez (2019) 2nd summer school of Medical Physics

2.2.1 Geant4-DNA y TOPAS-nBio

Un ejemplo concreto de software basado en métodos MC es Geant4-DNA. Este es un conjunto de librerías computacionales (toolkit) de propósito general, para la simulación del transporte e interacción de radiación con la materia mediante métodos Monte Carlo Track Structure, desarrollado por una colaboración internacional. Geant4-DNA permite simular daño biológico debido a radiación ionizante a escalas celulares y subcelulares [Incerti S., Baldacchino G. et al, 2010]. Se distribuye junto con Geant4, un software de transporte condensado desarrollado inicialmente en la Organización Europea para la Investigación Nuclear (CERN) con la intención original de generar aplicaciones para la investigación de altas energías. Ya que Geant4/Geant4-DNA están desarrollados en lenguaje C++, se puede utilizar la versatilidad de la programación orientada a objetos. El hecho de que se ha optado por la estrategia del software libre, permite contribuir para extender esta librería e incluir nuevos módulos que contemplen modelos específicos para aplicaciones en áreas de investigación particulares, uno de estos ejemplos es TOPAS. Este proyecto que empezó en el 2010 integrado por un consorcio de instituciones en Estados Unidos: Universidad de California San Francisco, Laboratorio Nacional SLAC y el Hospital General de Massachusetts, Perl et al 2012, Faddegon et al 2020.

Por otra parte, tenemos el software TOPAS-nBio [McNamara et al 2018, Ramos-Mendez et al., 2018, Schuemann J et al. 2019], que es una extensión de TOPAS. El sistema TOPAS/TOPAS-nBio se encuentra en desarrollo para facilitar la investigación en radioterapia, radiología, radioquímica y radiobiología. El sistema permite recrear las condiciones celulares y sub celulares incluyendo modelos geométricos de ADN y mitocondrias; así como modelos químicos para propagar los productos de la radiolisis. El enfoque de TOPAS/TOPAS-nBio, y quizá su aspecto más importante,

es poner al alcance de investigadores de otras áreas las herramientas computacionales necesarias para hacer simulaciones enfocadas a la radiobiología sin necesidad de ser unos expertos en física o en programación.

Estos serán los pilares en cuanto al desarrollo de software de simulación Monte Carlo Track Structure que se realizaremos para el resto del trabajo de investigación.

2.3 Bases teóricas: Radiólisis del agua

La radiólisis del agua se define como *la descomposición de las moléculas de agua por la interacción con radiación ionizante* [Le Caër S. (2011)]. En los tratamientos contra el cáncer que utilizan radiación ionizante de baja LET ($<0.3 \text{ keV}/\mu\text{m}$), la mayoría del daño al material genético se da de manera indirecta ($> 80\%$) [Nimrat Chatterjee & Graham C. Walker (2017)]. Esta contribución es de las especies radiolíticas oxidativas (ROS por sus siglas en inglés) que interactúan con el ADN, rompiendo las hebras que forman la estructura de doble hélice. Dependiendo de la complejidad espacial de estos rompimientos, y si se dan en una o ambas hebras del ADN, los rompimientos se clasifican en simples (SSB) o dobles (DSB). La cantidad de estos rompimientos es un factor determinante en la supervivencia celular, ya que, al haber varios DSB agrupados, se dificulta la reparación de ADN y eventualmente se infringe muerte celular. Después de la interacción de radiación con la materia, las especies radiolíticas primarias son generadas en una escala de tiempo muy corta, en el orden de picosegundos, estas se mueven en el medio por difusión y reaccionan con otras especies químicas creando productos hasta que su distribución espacial están lo suficientemente dispersa como para que existan más reacciones, a esta etapa se le llama etapa estable [Plante I. (2017)]

El proceso de la radiólisis es complejo. Para modelarlo, se divide el proceso de interacción de radiación en tres etapas (figura 3) que se extienden en periodos de tiempo determinados y que se caracterizan por mecanismos específicos, descritos a continuación:

- Etapa física: la radiación ionizante atraviesa el medio acuoso biológico depositando su energía en él mediante colisiones elásticas e inelásticas. Esto puede provocar la excitación (H_2O^*) o la ionización ($\text{H}_2\text{O}^+ + e^-$) de las moléculas de agua, la producción de electrones sub-excitados, así como el daño directo al material genético. Esta etapa se da desde el momento de incidencia de la irradiación (0s) hasta 10^{-15}s .
- Etapa fisicoquímica: las moléculas de agua excitadas y ionizadas se disocian para generar las especies químicas primarias (tabla 5). Por otro lado, los electrones sub excitados continúan perdiendo energía a través de vibraciones con el medio hasta la termalización (a 0.025 eV),

en este punto se encapsulan con moléculas de agua convirtiéndose en electrones acuosos (e_{aq}^-). Esta etapa se extiende desde 10^{-15} s hasta 10^{-12} s.

- Etapa química: las especies químicas primarias se difunden en el medio siguiendo una dinámica Browniana e interactúan reaccionando unas con otras produciendo especies químicas secundarias. La reacción entre dos especies químicas se modela siguiendo funciones de probabilidad específicas que serán descritas más adelante. Esta etapa dura desde 10^{-12} s hasta 10^{-6} s y la cantidad de especies químicas que sobreviven se cuantifican por los valores G. El valor G se define como la cantidad de especies químicas producidas por un depósito de 100eV de energía en el medio.

Radiolisis del Agua.

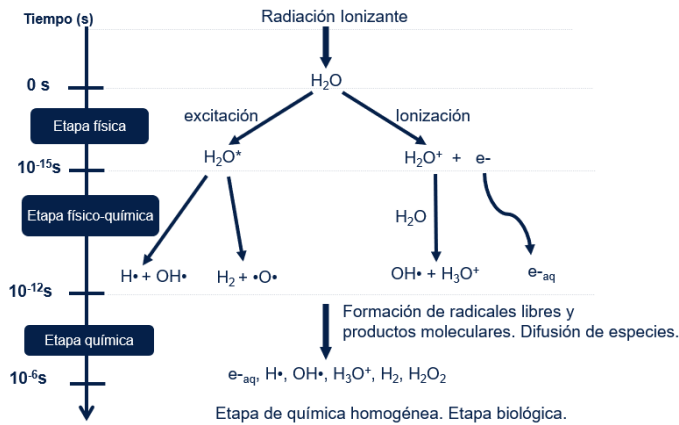


Figura 2.4. Esquema del proceso de Radiólisis del agua separado por etapas, imagen obtenida de: Monte Carlo track-structure simulations of DNA damage part II: indirect damage. José Ramos-Méndez (2019) 2nd summer school of Medical Physics

2.4 Simulación del Transporte de Radiación a través del medio acuoso para la etapa física

Para modelar el fenómeno de la radiación que atraviesa un material existen distintos métodos: transporte condensado y track-structure. El transporte condensado reduce considerablemente el coste computacional al condensar a las trayectorias reales a una “promedio” discretizada en los llamados “steps” (figura 2.3). Las simulaciones de transporte condensado se usan en radioterapia para calcular dosis en volúmenes de dimensión micrométrica o mayor; en estos casos. Sin embargo, para las escalas microbiológicas esta aproximación no es suficiente para el nivel de detalle requerido, por lo que se opta por el método de Track-Structure o transporte analítico (detallado), que simula paso a paso todas y cada una de las interacciones y pérdida de energía de las partículas cargadas. Esto da como resultado

reproducciones estadísticamente equivalentes al fenómeno real y permite simular a detalle volúmenes nanométricos (como segmentos de ADN).

El método de Monte Carlo Track Structure (MCTS) fue utilizado para recrear la irradiación del medio acuoso, que genera a su vez la distribución inicial de las especies químicas y la fase de química no homogénea del proceso. En el esquema de simulación del MCTS, se asume que en cada punto de interacción inelástica (ionización y excitación) con el medio acuoso, existe una molécula ionizada o excitada de agua, y a partir de aquí se dan los procesos de disociación considerando varios canales de decaimiento. Para esto, se utiliza un muestreo aleatorio utilizando las probabilidades de la tabla 2.4 colocando las especies químicas primarias alrededor del punto de ionización o excitación (Kreipl 2009, Karamitros 2009, Ramos-Mendez 2018, Shin 2020) A partir de aquí la etapa química se modela utilizando métodos paso a paso o de tiempos de reacción independiente, como se muestra en las siguientes secciones.

	Proceso	Canal de decaimiento	Fracción (%)
Ionización (H_2O^+)			
1b_{1,3},	Decaimiento disociativo	$H_3O^+ + \cdot OH$	100
Excitación (H_2O^*)			
A¹B¹	Decaimiento disociativo	$\cdot OH + H\cdot$	65
	Relajación	$H_2O + \Delta E$	35
B¹ A¹	Auto ionización	$H_3O^+ + \cdot OH + e_{aq}^-$	55
	Decaimiento disociativo	$H_2 + \cdot O\cdot$	15
	Relajamiento	$H_2O + \Delta E$	30
Ryd, bandas de difusión	Auto ionización	$H_3O^+ + \cdot OH + e_{aq}^-$	50
	Relajación	$H_2O + \Delta E$	50

Tabla 2.1. Procesos de disociación del agua. Información obtenida de: Time- and space-resolved Monte Carlo study of water radiolysis for photon, electron and ion irradiation (2009) por Maximilian S. Kreipl, Werner Friedland & Herwig G. Paretzke

2.5 Método Independent Reactions Times (IRT)

La simulación de la etapa química del proceso de radiólisis requiere que se pueda describir de manera detallada la dinámica que domina la difusión de especies químicas en un medio. La primera opción

es el transporte Monte Carlo paso a paso (Step by Step), es decir, recrear la dinámica Browniana mediante un modelo de “caminata aleatoria” caracterizada por el coeficiente de difusión de cada especie química. En este modelo, se puede llevar el recuento de la posición de cada una de las especies después de cada incremento en el tiempo y verificar que se cumplan las condiciones para que se den las reacciones químicas. Sin embargo, dada la cantidad de especies químicas que se producen en las simulaciones, la demanda de poder computacional es muy alta (de complejidad $O(N^2)$ para cada paso) [Frongillo Y. et al (1998), Karamitros M. et al. 2012, Ramos-Mendez. 2018], por lo que existen métodos alternativos que se pueden usar.

Uno de ellos es el llamado Reacciones Independientes del Tiempo (IRT) que es hasta tres órdenes de magnitud más rápido que el Monte Carlo step-by-step completo” [Ramos-Mendez et al 2020]. En este método la trayectoria completa de cada especie química no se modela. El método consiste en hacer una lista con todas las combinaciones posibles de reacciones químicas y de las especies químicas producidas justo después de la radiólisis (figura 2.6), y en lugar de calcular la probabilidad de reacción a cada paso, se calcula el tiempo probable en el que puede ocurrir una reacción (figura 2.6). Esta información se almacena en una lista. El tiempo de reacción es muestreado de manera independiente para cada uno de los pares, siguiendo las funciones de distribución de probabilidad marginal de los tiempos de reacción en función de la separación inicial de cada par (sección 2.7) [N. J. B. Green & M. J. Pilling (1989)]. La lista de estos pares de reactivos se ordena según el tiempo de reacción muestreado de menor a mayor (figura 2.6). Posteriormente, una a una las parejas se hacen reaccionar, esto es, se eliminan de la lista y, si existieran productos de la reacción en estos pares, estas se agregan al esquema al tiempo de reacción, y se calculan los tiempos de reacción con las especies existentes. La lista se reordena considerando a los nuevos productos y a los nuevos tiempos de reacción. Este proceso se repite hasta que no quedan más parejas reactivas o hasta que se alcanza un límite de tiempo delimitado por el usuario. En nuestro caso, este será la duración de la etapa química del proceso de la radiólisis (figura 2.6). De esta manera, en solo unas cuantas iteraciones el modelado completo de reacción-difusión puede ser resuelto completamente. A continuación, se derivará la expresión del tiempo probable en este modelo.

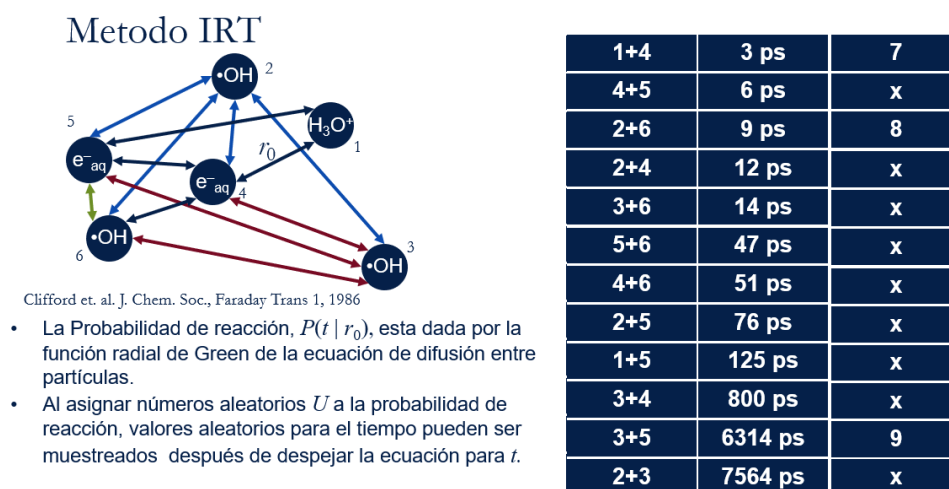


Figura 2.6. Esquema del funcionamiento del método IRT. Imagen obtenida de: Monte Carlo track-structure simulations of DNA damage part II: indirect damage. José Ramos-Méndez (2019) 2nd summer school of Medical Physics

2.6 Modelos químicos

El método IRT está basado en el muestro de las distribuciones de probabilidad de reacción entre pares de especies químicas, por otra parte, estas distribuciones están en términos de parámetros que son función de la temperatura como las tasas de reacción k_i . La herramienta matemática que ha sido usada para simular todo tipo de reacciones químicas y bioquímicas es la solución de la ecuación de difusión usando funciones de Green (GFDE por sus siglas en ingles), que ha sido validada en simulaciones químicas por Plante I. (2017).

Para una reacción química entre dos reactivos A y B que se encuentran en las posiciones iniciales r_{A_0} y r_{B_0} y que da como resultado el reactivo C , el cuál es mediada por una tasa de reacción $k_a(T)$ que depende de la temperatura, se puede representar como:



La manera en que se modelan las especies químicas es como sigue, se considera que son *partículas* que se difunden en un medio de manera Browniana, y que tienen un radio de reacción, esto es, si la distancia que separa a dos especies químicas reactivas entre si es menor o igual a este radio, entonces ocurre la reacción química (reacción totalmente controlada por difusión). La deducción detallada de la teoría mostrada en Plante I. (2011), (2015) y (2017), Green N. J. B., Pilling M. J. et al (1990), de Frongillo Y. (1998), en la que están basados los algoritmos con los que se obtienen las cantidades está fuera del objetivo de este trabajo de tesis. Aquí se resumen las expresiones más importantes. La ecuación de difusión que describe la dinámica que se dará entre estos dos reactivos está dada por:

$$\frac{\partial}{\partial t} p(r, t|r_0) = D \nabla^2 p(r, t|r_0) \quad (14)$$

Donde t es el tiempo, r_0 es la distancia inicial de separación entre A y B y r es el radio de reacción, relacionado con el coeficiente de reacción (k_{dif}) dado por $k_{dif} = 4 \pi r^2 D$, con D la suma de coeficientes de difusión. Esta debe ser resuelta para cada tipo de reacción, ya que las condiciones de frontera son específicas para cada una de estas. El caso más sencillo es el de las reacciones totalmente controladas por difusión entre partículas neutras, la solución de la ecuación diferencial de difusión en este caso es:

$$4\pi r r_0 p_1(r, t|r_0) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \left\{ \exp \left[-\frac{(r - r_0)^2}{4Dt} \right] - \exp \left[-\frac{(r + r_0 - 2R)^2}{4Dt} \right] \right\} \quad (15)$$

Para poder obtener la probabilidad de reacción se tiene que integrar esta expresión sobre todo el espacio

$$P_1(t|r_0) = 1 - \int_R^\infty 4\pi r^2 p_1(r, t|r_0) dr = \frac{R}{r_0} \text{Erfc} \left[\frac{r_0 - R}{\sqrt{4Dt}} \right] \quad (16)$$

Teniendo en cuenta que la función $P_1(t|r_0)$ es una función de probabilidad, tomará valores entre 0 y 1, por lo que esta relación se puede invertir para muestrear tiempos para el método IRT usando Monte Carlo.

$$t_i = \frac{1}{4D} \left[\frac{r_0 - R}{\text{Erfc}^{-1} \left(\frac{r_0}{R} \xi_i \right)} \right]^2 \quad (17)$$

Donde ξ_i es un número uniformemente distribuido entre 0 y 1 para poder calcular así los tiempos de reacción t_i [Green N. J. B., Pilling M. J. et al (1990)].

Siguiendo un procedimiento análogo se puede llegar a una forma parecida para las reacciones entre partículas cargadas, en las que existe un escalamiento de las distancias naturales debido a un potencial de Coulomb, usando entonces distancias efectivas:

$$P_{III}(t|r_0) = \frac{R_{eff}}{r_{eff}} \text{Erfc} \left[\frac{r_{eff} - R_{eff}}{\sqrt{4Dt}} \right] \quad (18)$$

Que igualmente puede ser invertida y utilizada para obtener los tiempos de reacción para el método IRT muestreando la variable aleatoria ξ_i :

$$t_i = \frac{1}{4D} \left[\frac{r_{eff} - R_{eff}}{\text{Erfc}^{-1} \left(\frac{r_{eff}}{R_{eff}} \xi_i \right)} \right]^2 \quad (19)$$

Las cantidades r_{eff} y R_{eff} están relacionados con R y r_0 , respectivamente por:

$$R_{eff} = \frac{r_c}{1 - \exp(r_c/R)} \quad r_{eff} = \frac{r_c}{1 - \exp(r_c/r_0)} \quad (20)$$

Donde r_c es el radio de Onsager, que se define como “la distancia a la cual la energía electrostática es igual a la energía termal” [Plante I. (2011)] y está dado por la siguiente expresión, en función de la temperatura:

$$r_c = \frac{e^{-2}}{4\pi\epsilon\epsilon_0 k_B T} \quad (21)$$

Donde:

- e^- es la carga del electrón
- k_B es la constante de Boltzmann
- T es la temperatura en kelvin
- $\epsilon_0 = 8.85418781762037 \times 10^{-12} F/m$ es la permitividad del vacío.
- ϵ es la permitividad relativa del agua y está dada por el siguiente polinomio adimensional [Archers D.G. & Wangb P. (1989)]:

$$5321.0 \cdot T^{-1} + 233.76 - 0.9297 \cdot T + 0.001417 \cdot T^2 - 8.292 \times 10^{-7} \cdot T^3 \quad (22)$$

Otros tipos de reacción tienen una forma más compleja, por ejemplo, son las reacciones parcialmente controladas por difusión entre partículas neutras (tipo 2). Es decir, en las que la velocidad incidente de cada partícula (determinado por el coeficiente de activación - k_{act}) afecta la reacción. En otras palabras, si la velocidad de las partículas es suficientemente alta, entonces la reacción podría no ocurrir. En este caso la ecuación diferencial de difusión tiene como solución:

$$4\pi r r_0 p_{II}(r, t | r_0) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \left\{ \exp\left[-\frac{(r-r_0)^2}{4Dt}\right] + \exp\left[-\frac{(r+r_0-2R)^2}{4Dt}\right] \right\} + \alpha W\left(\frac{r+r_0-2R}{\sqrt{4\pi Dt}}, -\alpha\sqrt{Dt}\right) \quad (23)$$

- Donde: D es la suma de los coeficientes de difusión de los reactivos involucrados
- R es la suma de sus radios de reacción
- El factor α y la función W están dados por:

$$\alpha = \frac{k_{act} + 4\pi RD}{4\pi R^2 D} \quad W = \exp(2xy + y^2) \cdot \text{Erfc}(x + y) \quad (24)$$

Y la función que describe el tiempo de reacción que será utilizada por el método IRT para este tipo de reacción está dada por:

$$P_{II}(t|r_0) = 1 - \int_R^{\infty} 4\pi r^2 p_{II}(r, t|r_0) dr \quad (25)$$

$$P_{II}(t|r_0) = \frac{\alpha R + 1}{\alpha r_0} \left[\text{Erfc} \left(\frac{r_0 - R}{\sqrt{4Dt}} \right) - W \left(\frac{r_0 - R}{\sqrt{4Dt}}, -\alpha\sqrt{Dt} \right) \right] \quad (26)$$

En este caso la relación que existe entre estas funciones de probabilidad y la temperatura se da a través de algunos de los parámetros de P_{II} . Manteniéndonos en el ejemplo de las reacciones de tipo 2, los coeficientes de difusión para los reactivos y el coeficiente de reacción k_{act} dentro del parámetro α son funciones de la temperatura, para la mayoría de las reacciones de tipo 2 el parámetro k_{act} que determina a la función de probabilidad esta dado por la ecuación de Noyes:

$$\frac{1}{k_{act}} = \frac{1}{k_{obs}} - \frac{1}{k_{dif}} \quad (27)$$

A su vez, la componente k_{obs} sigue un ajuste de Arrhenius para los datos experimentales de Elliot & Barnes del 2008:

$$k_{obs} = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (28)$$

Donde A es el factor pre exponencial en unidades de $1/MS$, E_a es la energía de activación con unidades kJ/mol , T es la temperatura en kelvin y $R = 0.0083146$ kJ/K mol es la constante molar de los gases.

Por otra parte, el coeficiente k_{dif} sigue la ecuación de Smoluchowski:

$$k_{dif} = 4 \pi \cdot \beta \cdot D \cdot R \cdot d(t) \cdot N_A \quad (29)$$

Donde, D es la suma de los coeficientes de difusión y R es la suma de sus radios de reacción. β es un factor estadístico de spin [Frongillo Y. (1998), Plante I. (2017)], $N_A 6.02214085 \times 10^{23}/mol$ el

número de Avogadro y $d(t)$ es conocido como el factor de Debye se ocupa solamente cuando se tratara de una reacción entre partículas cargadas, y este dado por:

$$d(t) = \frac{\delta}{e^{\delta} - 1} \quad \text{con } \delta = Z_A Z_B \frac{r_c}{R} \quad (30)$$

Donde Z_i es la carga neta de cada reactivo y r_c el radio de Onsager definido más arriba en esta misma sección. Estas son todas las ecuaciones que describen el comportamiento de las tasas de reacción en función de la temperatura para todas las reacciones ocupadas en nuestro trabajo de investigación, aunque es preciso declarar para cada caso en específico exactamente que ecuación se ocupara para cada componente de la tasa de reacción.

Son estos ajustes aportados por la investigación de Elliot A.J & Barnes en 2008 los que implementaremos en TOPAS n-Bio, extendiendo así el software basado en Monte Carlo Track Structure para que el método IRT interno contemple la temperatura del medio y los cambios en las tasas de reacción y difusión de las especies radiolíticas que este incremento provoca, de tal manera que sea la columna sobre la que se sostiene este trabajo de investigación y que esté disponible para futuras aplicaciones que requieran tomar en cuenta cambios en la temperatura del medio.

Capítulo 3 Metodología y Resultados

El objetivo de este trabajo es generar una aplicación computacional para cuantificar el daño indirecto al ADN en función de la temperatura.

Todas las simulaciones computacionales en este trabajo de investigación se hicieron utilizando el software TOPAS-nBio [McNamara 2018, Ramos-Méndez 2018, Schuemann 2019]. Como se mencionó en la sección anterior, TOPAS-nBio facilita la simulación Monte Carlo del transporte de radiación ionizante a través de la materia incluyendo a la etapa química, que sigue al proceso de radiólisis del agua. El software provee modelos físicos, químicos y geométricos biológicamente relevantes para la simulación del daño biológico causado por la radiación a etapas tempranas después de su interacción ($\leq 1 \mu\text{s}$). Está basado en Geant4-DNA [Incerti et al 2010a, 2010b, 2018, Bernal et al 2015], que es un conjunto de librerías en C++ de Monte Carlo Track-Structure, desarrollado por una colaboración internacional a partir del 2010, y que es el único en su tipo de acceso libre.

3.1 Parámetros para la simulación de la etapa química dependiente de la temperatura

Nuestro primer objetivo fue la implementación de los modelos químicos, descritos en el trabajo de A.J. Elliot & Barnes del 2008, en TOPAS n-Bio. Estos modelos fueron desarrollados a partir de la compilación y análisis extensivo de datos experimentales disponibles hasta el 2008. Los datos contienen la información sobre las tasas de reacción entre especies químicas y coeficientes de difusión a diferentes temperaturas. Un ajuste exponencial se ocupó para describir la relación entre la temperatura y los datos experimentales.

A partir de la teoría descrita en el capítulo anterior, puede ocurrir que la tasa de reacción para casos determinados tenga múltiples componentes (ecuaciones 27-29). En esos casos, pueden existir datos experimentales para alguna componente a los que se pueden ajustar polinomios o funciones exponenciales; mientras que otras componentes pueden calcularse, mediante la teoría de Smoluchowsky-Debye. Por último, aquellas componentes de las que no se conocen datos experimentales o funciones explícitas, se pueden deducir mediante la ecuación de Noyes (27). A pesar de que Elliot describe funciones polinomiales o potenciales, para este trabajo de investigación se asume que todos los ajustes para los datos experimentales son de tipo Arrhenius. La figura 3.1, muestra tasas de reacción en función de la temperatura para un grupo representativo de reacciones; en la imagen, se muestran los valores calculados por TOPAS-nBio y los datos de la literatura, verificando que la implementación fue correcta.

La simulación de la etapa química (sección 2.7) ocupó un esquema de 10 reacciones principales usado por Jay A. LaVerne & Simon M. Pimblott del año 1993 “Yields of Hydroxyl Radical and Hydrated Electron Scavenging Reactions in Aqueous Solutions of Biological Interest”. Como se mostrará, estas recrean los resultados experimentales de valores G en el rango de picosegundos para electrones interactuando en agua a 25 C. En la tabla 3.1 se observan en orden esas reacciones, el tipo de reacción al que pertenecen (en la clasificación de Frongillo et al 1997, ver sección 2.7) y el tipo y parámetros de ajuste que se ocupó para escalar la tasa de reacción.

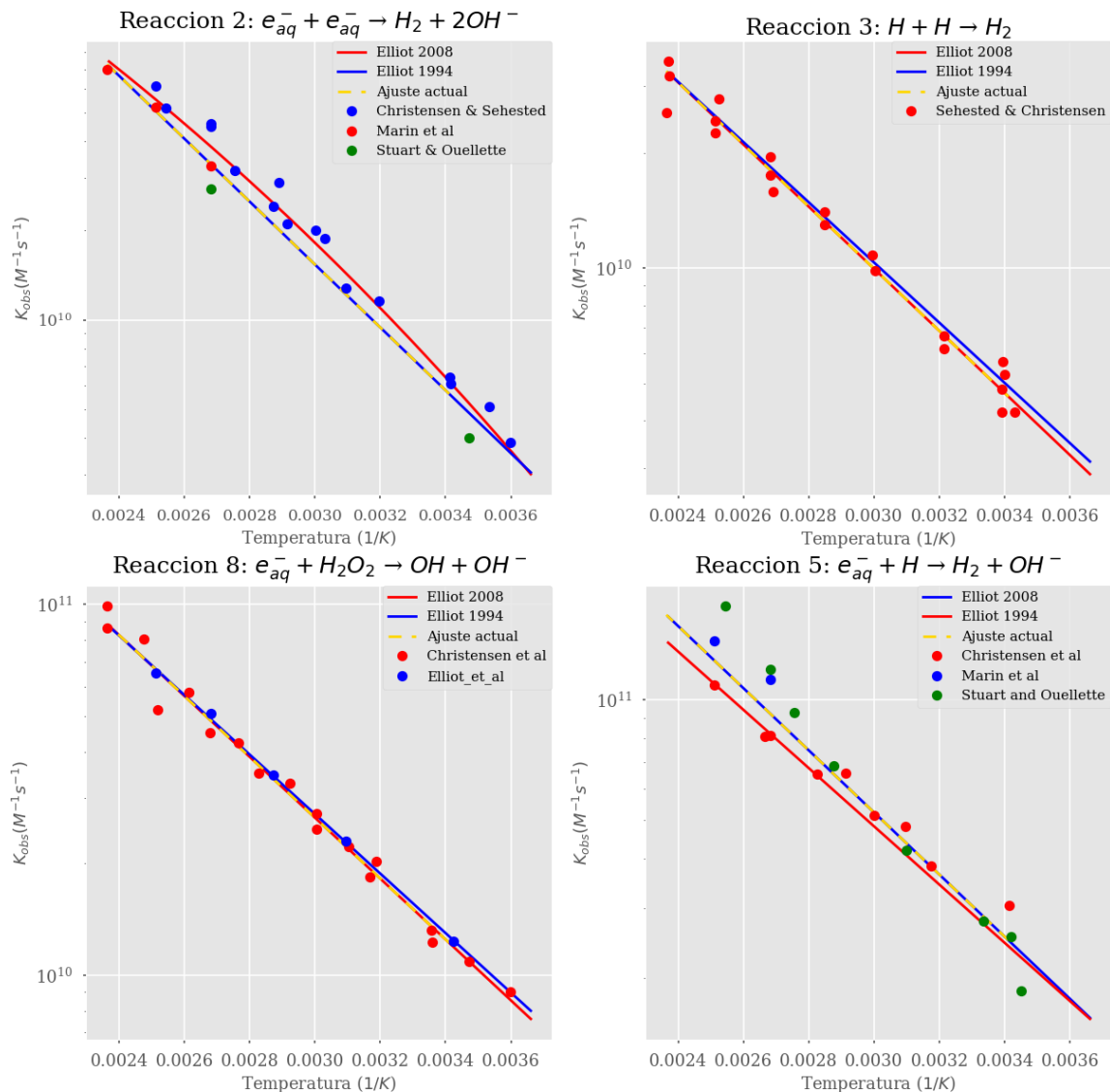


Imagen 3.1. Tasas de reacción representativas para diferentes las reacciones propuesta por Elliot & Barnes en 2008 (líneas solidas rojas), Elliot en 1994 (líneas solidas azules), y la salida de TOPAS-nBio (líneas punteadas). Los datos experimentales de la literatura compilados por los autores se muestran con símbolos.

No y Tipo de Reacción		Reacción	$k_{obs} [M^{-1}s^{-1}]$	$k_{dif} [M^{-1}s^{-1}]$	$k_{act} [M^{-1}s^{-1}]$
R1	II	$H + H_2O_2 \rightarrow OH$	Ajuste de Arrhenius (28): $A = 1.79 \times 10^{11} / Ms$ $E = 21.06 \text{ kJ/mol}$	Ecuación de Smoluchowski (29): $\beta = 1, R = 0.40 \text{ nm}$	Ecuación de Noyes (27)
R2	II	$H + OH \rightarrow H_2O$	Ajuste de Arrhenius (28): $A = 4.26 \times 10^{11} / Ms$, $E = 9.07 \text{ kJ/mol}$	Ecuación de Smoluchowski (29): $\beta = 1, R = 0.41 \text{ nm}$	Ajuste de Arrhenius (28): $A = 0.178 \times 10^{12} / Ms$, $E = 4.50 \text{ kJ/mol}$
R3	II	$OH + OH \rightarrow H_2O_2$	Ecuación de Noyes (27)	Ecuación de Smoluchowski (29): $\beta = 1, R = 0.44 \text{ nm}$	Ajuste de Arrhenius (28): $A = 0.0369 \times 10^{12} / Ms$, $E = 3.0 \text{ kJ/mol}$
R4	II	$H_2O_2 + e_{aq}^- \rightarrow OH^- + OH$	Ajuste de Arrhenius (28): $A = 7.70 \times 10^{12} / Ms$, $E = 15.71 \text{ kJ/mol}$	Ecuación de Smoluchowski (29): $\beta = 1, R = 0.71 \text{ nm}$	Ecuación de Noyes (27)
R5	II	$OH + e_{aq}^- \rightarrow OH^-$	Ecuación de Noyes (27)	Ecuación de Smoluchowski (29): $\beta = 1, R = 0.72 \text{ nm}$	Ajuste de Arrhenius (28): $A = 0.0304 \times 10^{12} / Ms$, $E = -3.5 \text{ kJ/mol}$
R6	III	$H_3O^+ + OH^- \rightarrow H_2O$	Ecuación de Debye (29): $\beta = 0.1, R = 0.842 \text{ nm}$	n/a	n/a
R7	III	$e_{aq}^- + e_{aq}^- \xrightarrow{2H_2O} H_2 + 2OH^-$	Ecuación de Debye (29): $\beta = 0.25, R = 1.0 \text{ nm}$	n/a	n/a
R8	IV	$e_{aq}^- + H_3O^+ \rightarrow H + H_2O$	Ajuste de Arrhenius (28): $A = 1.24 \times 10^{12} / Ms$ $E = 10.1 \text{ kJ/mol}$	Ecuación de Debye (29): $\beta = 1, R = 0.75 \text{ nm}$	Ecuación de Noyes (27)
R9	V	$H + H \rightarrow H_2$	Ajuste de Arrhenius (28): $A = 5.40 \times 10^{12} / Ms$ $E = 15.52 \text{ kJ/mol}$ $R = 1.19 \text{ nm}$	Ecuación de Smoluchowski (29): $\beta = 0.25, R = 0.38 \text{ nm}$	n/a
R10	V	$H + e_{aq}^- \xrightarrow{H_2O} H_2 + OH^-$	Ajuste de Arrhenius (28): $A = 1.14 \times 10^{13} / Ms$ $E = 14.93 \text{ kJ/mol}$ $R = 1.13 \text{ nm}$	n/a	n/a

Tabla 3.1. Esquema de reacciones utilizadas por Jay A. LaVerne & Simon M. Pimblott (1993) para recrear la radioquímica del agua seguida de la ecuación utilizada para escalar las componentes de las tasas de reacción respecto a la temperatura para cada una de ellas y los valores para cada parámetro que se utilizaron.

La cantidad de interés que se calculará para verificar esta implementación es el valor G. Este se define como la cantidad de especies químicas producidas o perdidas por cada 100 eV de energía depositada. Esta cantidad evoluciona con el tiempo comenzando con un valor alto para especies químicas primarias y un valor bajo para productos. La configuración de la simulación Monte Carlo para la etapa química, consistió en un volumen semi infinito de agua. En el centro de este se colocó una fuente isotrópica de electrones mono energéticos. La energía inicial fue de 1 MeV. El transporte de esos electrones se terminó después de depositar los primeros 10 keV de energía [Ramos-Mendez et al 2018, Shin et al 2020]. Cada electrón y sus electrones secundarios (es decir, una historia) se trataron independiente de otros electrones primarios. En total, 5000 historias se simularon, con 4 repeticiones utilizando diferente semilla aleatoria. Los valores G al tiempo 1 μ s, se recuperaron en función de la temperatura en un intervalo de 20 a 150° C. Los resultados se compararon con datos publicados de Elliot & Barnes (2008) y de Plante I. (2015).

En la figura 3.2 se aprecia esta evolución temporal desde el final de la etapa pre-química (1 ps) hasta que acaba la etapa química (1 μ s). En la misma figura, datos experimentales de la literatura a 7 ps y

cerca de 1 μs son mostrados para electrón solvado e hidroxilo. Como se observa, los datos a tiempos cortos coinciden dentro del error experimental, de la misma forma para 1 μs . Se observa el decaimiento del hidroxilo y al mismo tiempo el aumento de peróxido de hidrógeno, que resulta de la reacción $\cdot\text{OH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$. A tiempos cortos ($\sim \text{ps}$), se observa el efecto de la temperatura en las reacciones a contacto dadas por la ecuación (26) para $\cdot\text{OH}$ y H_2O_2 , ya que, a pesar de producirse con la misma calidad de radiación, los valores G difieren a 1 ps para diferentes temperaturas. Se observa que para el electrón solvatado a tiempos cortos, a mayores temperaturas el valor G es menor y a tiempos largos esto se invierte.

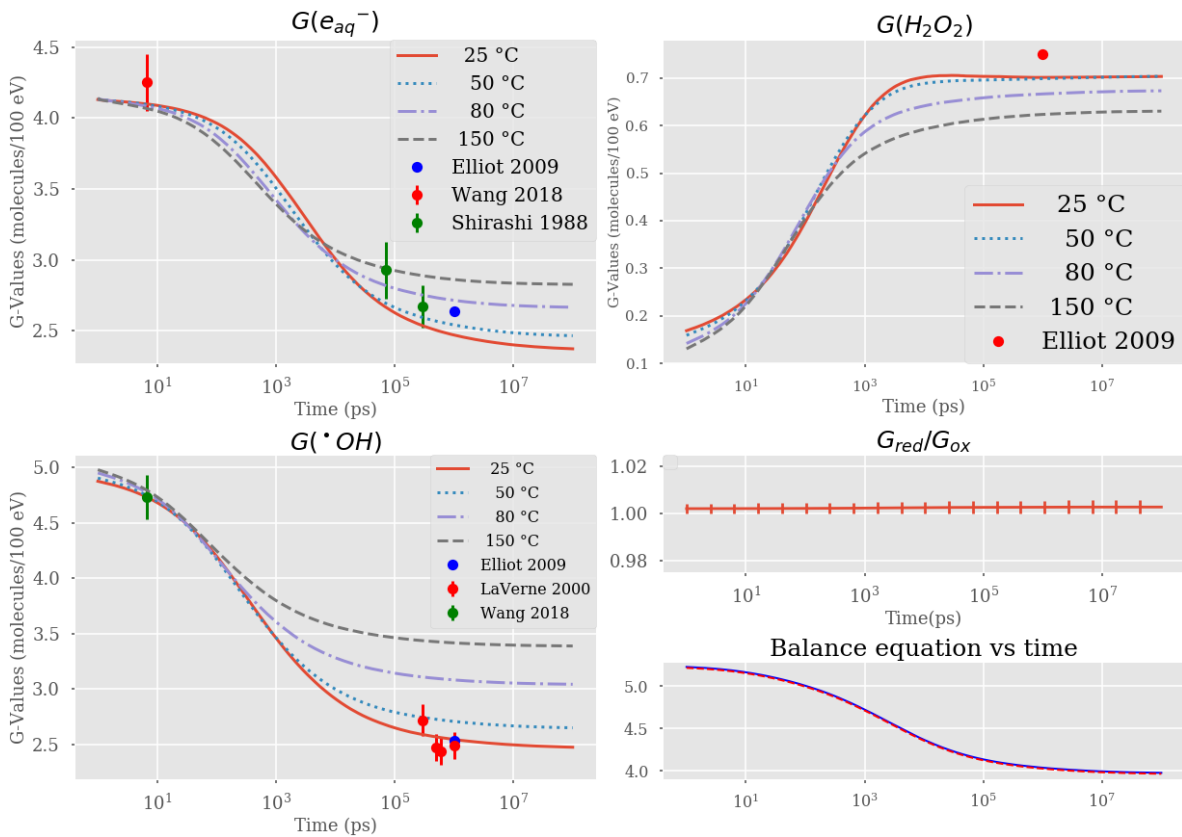


Imagen 3.2. Evolución temporal de los valores G de varias especies químicas a distintas temperaturas, en la esquina inferior izquierda se presentan los resultados para la ecuación de balance.

Además, una medida de consistencia para la validez de la simulación se da al comprobar la ecuación de balance, en el que el valor G total de las especies reductoras G_{red} debe de ser igual al de las especies oxidativas G_{ox} , ya que la conservación de la materia se debe cumplir. Esta ecuación está descrita en el trabajo de Marie-Anne Herve´ du Penhoat, Thomas Goulet et al del 2000 “Radiolysis of Liquid Water at Temperatures up to 300 °C: A Monte Carlo Simulation Study”:

$$G_{red} = G_{e_{aq}^-} + G_H + 2G_{H_2}$$

$$G_{ox} = G_{OH} + 2G_{H_2O_2} + 3G_{HO_2} + G_{O^-} + 2G_{HO_2^-} + 3G_{O_2^-} + 4G_{O_2} + 3G_{O_3P} + 5G_{O_3^-} + 6G_{O_3} \quad (31)$$

$$G_{red} = G_{ox}$$

Los resultados de los valores G obtenidos al estado estable (1 μ s) en función de la temperatura, en un rango de 20 a 150°C se observan en la figura 3.3. Los valores calculados se comparan con datos experimentados compilados por Elliot & Bartels (2008), así como la comprobación de la ecuación de balance, satisfecha dentro del 0.3%. Como se observa, los resultados para los valores G simulados están dentro del rango de los datos experimentales y siguen la tendencia respecto a la temperatura correspondiente, es de esperarse que existan diferencias entre los resultados simulados y los datos experimentales por razones que se explicaran de manera detallada en el siguiente capítulo.

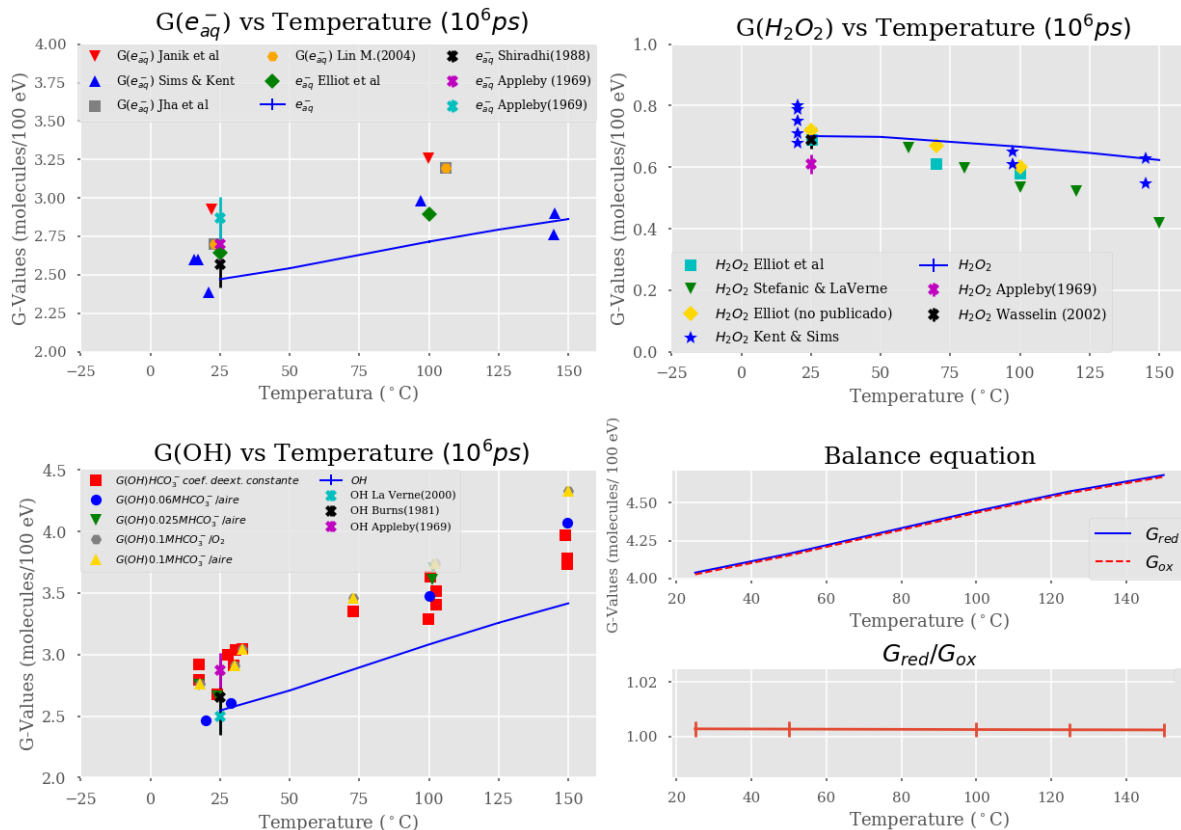


Imagen 3.3. Valores G de varias especies químicas vs la temperatura, comparados con los datos experimentales compilados por Elliot & Bartels (2008), en la esquina inferior izquierda se presentan los resultados para la ecuación de balance

Sin embargo, debemos mencionar que obtener mediciones experimentales para los valores G es un trabajo complicado. Por ejemplo, en el caso del OH la solución irradiada debe ser previamente preparada con cierto *scavenger* (solvente) que reaccionara con dicha especie química para dejar un producto, la cantidad de este producto es indicativa del valor G medido y la capacidad de neutralización (traducido de scavenging capacity) $k[B]$ del solvente, definida como la concentración

del solvente $[B]$ (en unidades de mol/dm^3 o M) multiplicado por su tasa de reacción k con la especie química B . Esta tiene unidades de $1/s$ y se puede entender como la “expectativa de vida de una especie química en presencia del solvente”, esto nos da una idea del tiempo aproximado en el que se mide el valor G de la especie química [Plante I. & Devroye L., 2017].

Ya que en el trabajo de Elliot y Barnes se indica que el *scavenger* utilizado para medir el valor G del OH fue el bicarbonato (HCO_3^-), provocando la reacción $\text{HCO}_3^- + \text{OH} \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$, entonces al medir la cantidad de CO_3^{2-} se puede inferir la cantidad de OH con el que reaccionó. Ya que también se especifican las concentraciones de bicarbonato que se utilizó para recuperar los valores G del OH para cada experimento y utilizando las recomendaciones de George V. Buxton, Clive L. Greenstock, et al 1988, podemos ver que el valor para la tasa de reacción entre el bicarbonato y el OH a 25°C es de $8.5 \times 10^6 /M/s$ y la energía de activación E_a , para esta reacción es de 21.2 kJ/mol por lo que podemos proponer el siguiente ajuste de Arrhenius en función de la temperatura para esta reacción:

$$k(T) = 4.39 \times 10^{10} \frac{1}{M s} e^{-\frac{21.2\text{kJ/mol}}{RT}} \quad (32)$$

Con esta información podemos reconstruir una gráfica de valor G en función del tiempo para varias temperaturas Elliot & Barnes (2008). Esta se observa en la figura 3.4, sin embargo, se debe remarcar que se están comparando simulaciones en agua pura con resultados experimentales en solventes; esta comparación no es adecuada, sin embargo, se muestra un método indirecto para futuras comparaciones.

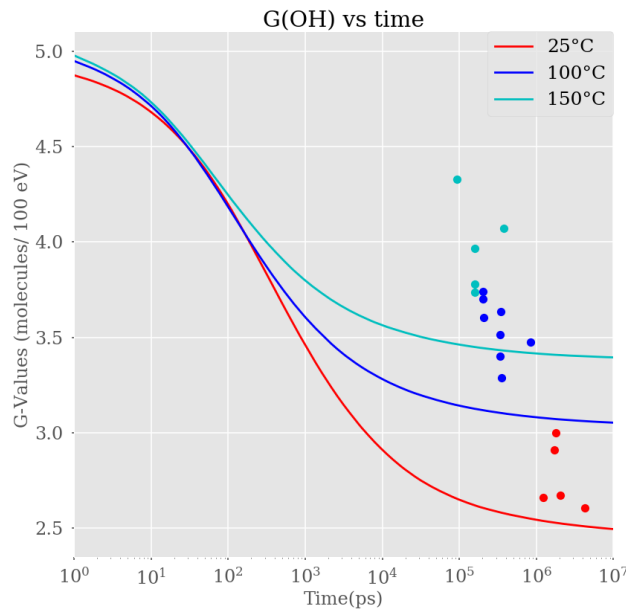


Imagen 3.4. Análisis de los datos experimentales aportados por Elliot A.J. y Bartels (2008) a tres diferentes temperaturas considerando la capacidad de neutralización del bicarbonato para estimar el tiempo de medición. Los datos están organizados por color según la temperatura particular de cada medición.

3.2 Simulación con ADN

Para simular las condiciones experimentales presentadas por Tomita H. en 1995, se ocupó un volumen en forma de cubo de $2\ \mu\text{m}$ de lado hecha de agua como material base. Se simuló la solución acuosa siguiendo las concentraciones de *scavengers* (solventes): $1 \times 10^{-3}\text{M}$ de TRIS; con una tasa de reacción con el OH de $1.5 \times 10^9 / \text{M/s}$, y EDTA con una concentración de $0.1 \times 10^{-3}\text{M}$; con tasa de reacción con el OH de $1.2 \times 10^9 / \text{M/s}$; se asumió que estas tasas de reacción no cambian con la temperatura, sin embargo, el coeficiente de difusión del OH si varió con la temperatura.

Se utilizó un modelo geométrico de plásmido pUC19 con 2686 bases pares de longitud. Aunque Tomita ocupa el pBR322, sin embargo, se ha demostrado experimentalmente que el número de rompimientos simples bajo las mismas condiciones de irradiación y normalizando por la longitud del plásmido dan resultados equivalentes para plásmidos de diferente tamaño. El modelo geométrico utilizado lleva el nombre de: “pUC19_Supercoiled.fab2g4dna”, que es parte de la extensión de Geant4-DNA y se construyó basándose en el algoritmo de Klenin V.K., Volodogskii A.V et al, reportado en detalle en su artículo de 1990 llamado “Computer Simulation of DNA Supercoiling.” La estructura geométrica del plásmido se construyó partiendo de curvas cerradas construidas a partir de un numero finito de segmentos rectos de igual longitud, respetando estrictamente las condiciones de temperatura y la constante de rigidez a la flexión del material. Este algoritmo fue aplicado para generar un modelo de plásmido pUC19 por E. A. Kümmerle & E. Pomplun en su artículo “A computer-generated supercoiled model of the pUC19 plasmid” del 2004.

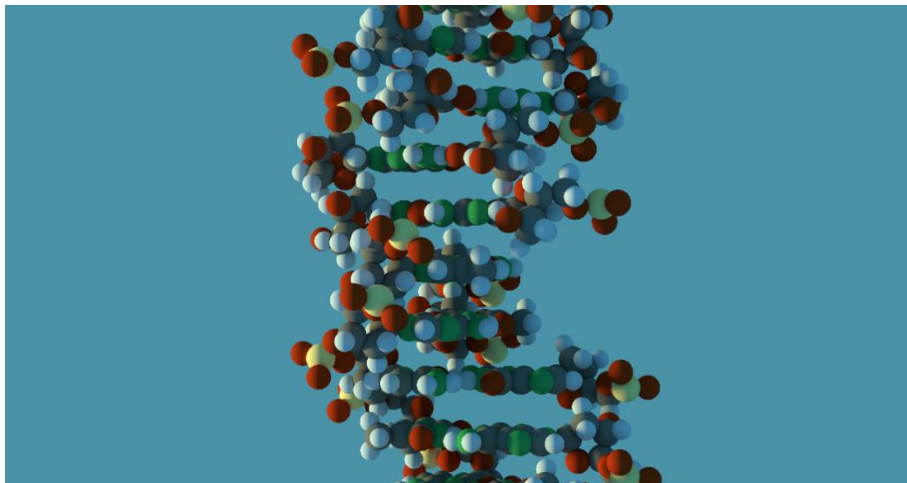


Imagen 3.5. Segmento del modelo geométrico del modelo de plásmido de ADN utilizado en la simulación renderizado en el programa de modelación 3D Blender.

En el experimento original se ocuparon pequeños tubos con capacidad para $500\ \mu\text{g}$ llenos con la solución acuosa y una concentración de material genético de $29.75\ \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Para poder recrear esta

concentración de ADN, se ocupó una esfera de $0.613\mu\text{m}$ radio dentro del volumen cúbico, en la que 9 plásmidos se colocaron distribuidos de manera uniformemente aleatoria. Esta muestra esférica es equivalente a la concentración original de material genético. Se utilizó esta alternativa ya que cada plásmido es un modelo geométrico complicado y el tubo original es comparativamente muy grande, al utilizar una pequeña muestra representativa del medio acuoso podemos asegurar que los resultados también serán representativos de una muestra completa irradiada bajo las mismas condiciones. En la figura 3.6, se muestra la configuración de la simulación.

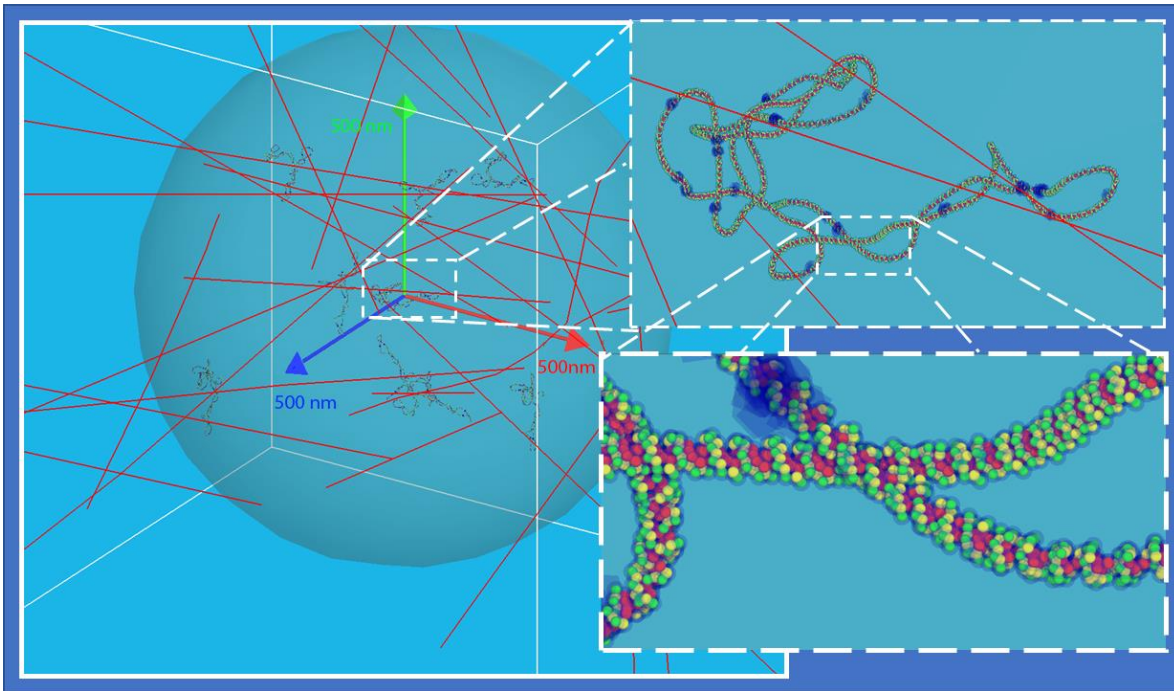


Imagen 3.6. Vista completa de la muestra esférica con el material genético distribuido en ella, mostrando la escala para poner en perspectiva las dimensiones de la simulación, se muestra además una vista general del modelo de plásmido pUC19 utilizado y un acercamiento para apreciar su estructura en detalle.

Los modelos físicos provistos por Geant4-DNA y facilitados por TOPAS-nBio, se declararon mediante un módulo conocido como el *constructor de física*. Este constructor, contiene la lista completa de todas las partículas, procesos físicos y modelos asociados necesarios para una simulación. El constructor de física empleado para este trabajo lleva el nombre de “G4EmDNAPhysics_option2”, que provee la mayor cobertura energética dentro de la extensión Geant4-DNA para los electrones en un rango de 7.4 eV hasta 1 MeV. Este constructor describe la interacción para electrones, fotones, protones, partículas alfa y sus estados excitados y iones pesados como: ${}^7\text{Li}$, ${}^9\text{Be}$, ${}^{11}\text{B}$, ${}^{12}\text{C}$, ${}^{14}\text{N}$, ${}^{16}\text{O}$, ${}^{28}\text{Si}$ y ${}^{56}\text{Fe}$ [Ramos-Méndez J., Wook-Geun S. et al. (2020)].

Para las interacciones inelásticas de los electrones, el modelo usado se basa en el formalismo de la función compleja de la respuesta dieléctrica del agua en su fase líquida. En este modelo, se consideran para el agua cuatro capas de ionización y cinco estados discretos de excitación electrónica. La ionización de las capas K se calculan mediante el modelo de la aproximación de encuentro binario con intercambio (traducido de Binary-Encounter-Approximation-with-Exchange) [Ramos-Méndez J., Wook-Geun S. et al. (2020)].

Se utilizó un modelo para la dispersión elástica de los electrones para la fase líquida del agua conocido como ELSEPA. Este se ha sido diseñado específicamente para “la simulación de la radiólisis del agua bajo la irradiación de electrones en el rango energético de mega electrón volts”. El modelo ha sido validado por Shin W.-G., Ramos-Mendez J. et al en el artículo “Evaluation of the influence of physical and chemical parameters on water radiolysis simulations under MeV electron irradiation using Geant4-DNA” del 2019.

En cuanto a la distancia de termalización para los electrones sub excitados, el modelo utilizado se deriva de la simulación Monte Carlo usando las secciones eficaces propuestas para el hielo amorfo por Michaud et al en “Cross sections for low-energy (1–100 eV) electron elastic and inelastic scattering in amorphous ice.” Del 2003 y escalada por Meesungnoen et al en: “Low energy electron penetration range in liquid water”. Para considerar las diferencias entre la fase líquida y amorfa del agua, el modelo se aplica con un límite energético superior de 7.4 eV. En el caso de los electrones que son producto de la auto ionización de las moléculas de agua en la etapa pre química de la radiólisis, la distancia de termalización se obtiene como si el electrón tuviera 1.7 eV de energía cinética, este resultado se sostiene en datos empíricos. [Ramos-Méndez J., Wook-Geun S. et al. (2020)].

En el experimento, la solución acuosa es irradiada con una dosis uniforme de 50 Gy utilizando una fuente de cobalto 60. Para simular esta irradiación, se colocó una fuente de electrones uniformemente distribuida en el cubo de agua de 2 μm de lado. La energía inicial de estos electrones sigue una distribución de probabilidad (mostrada en la imagen 3.7), que corresponde al espectro de energías iniciales de los electrones secundarios que la radiación gamma del ^{60}Co pone en movimiento a 5cm de profundidad en agua. Este espectro fue obtenido mediante una simulación auxiliar previa. Los electrones tuvieron direcciones isotrópicas inicialmente. El número de electrones primarios fue acumulado hasta que la dosis depositada de 50 Gy se alcanzó en la esfera que contuvo a los plásmidos. Por lo que el número de partículas iniciales varía de simulación a simulación; como es natural en una simulación computacional Monte Carlo. En promedio, se requirieron de 2820 electrones iniciales con un error estadístico de ± 9 para alcanzar la dosis de radiación prescrita.

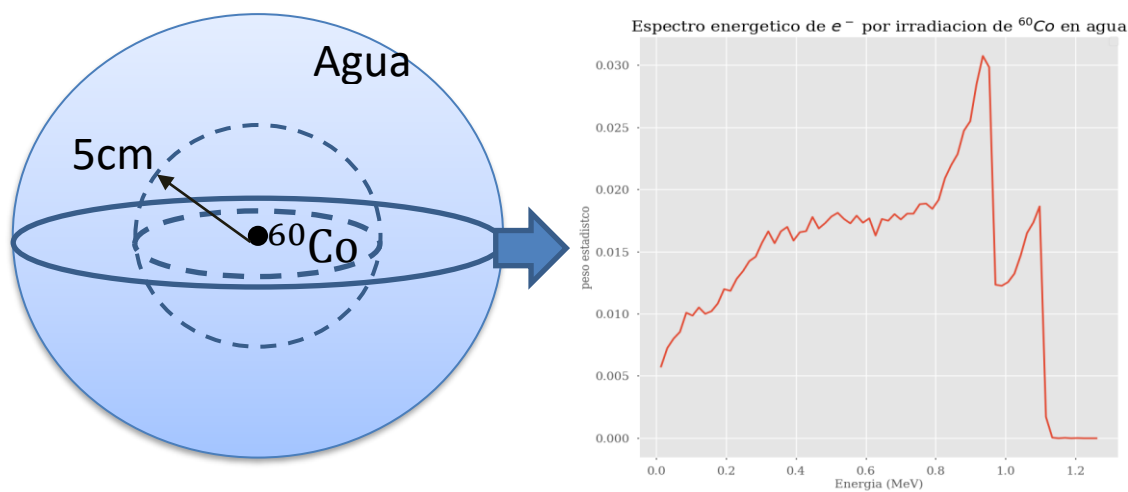


Imagen 3.7. Esquema de irradiación por cobalto 60 y espectro energético de electrones utilizado para la fuente de electrones isotrópica empleado en la simulación

Se consideraron las siguientes temperaturas para esta parte de la simulación: 20, 25, 30, 35, 40 y 45°C. Finalmente se hicieron 100 repeticiones para cada temperatura. Para llevar a cabo la simulación se utilizó una computadora Mac pro con 12 núcleos de procesamiento equipados con procesadores Intel pasión E5, una frecuencia de 22.7 GHz y 64 GB de memoria RAM. El tiempo computacional promedio para cada simulación fue de 25 minutos, con un error estadístico de $\pm 45.698s$.

3.3 Resultados para los rompimientos del ADN

En esta sección se presentan los resultados del número de lesiones en ADN con respecto a la temperatura, ya sea en forma de lesiones simples (SSB) o dobles DSB. Antes que nada, es importante señalar uno de los aspectos más destacados de la simulación computacional, es que las cantidades a las que una simulación computacional nos da acceso no siempre corresponden a cantidades medibles experimentalmente. Es más, estas herramientas de modelación van más allá permitiendo recrear fenómenos que de otra manera sería imposible observar debido a las limitantes tecnológicas.

Un primer ejemplo de esta problemática es el mismo Monte Carlo Track Structure. Si bien en la actualidad existen métodos sumamente sofisticados para recuperar las trayectorias que la radiación deja al atravesar la materia, es imposible por la misma naturaleza cuántica; y en específico por el principio de incertidumbre, conocer en todo momento la posición y energía exacta de una partícula. Sin embargo, mediante la simulación computacional estas barreras no existen y por ende nos abre un panorama más completo del fenómeno estudiado.

Si bien es cierto que todos los modelos teóricos implementados para una simulación computacional parten desde la fenomenología de un experimento, es importante señalar con notable hincapié que existen diferencias entre las observables en una simulación y en un experimento. Una vez aclarado esto podemos decir que en el presente trabajo de investigación existen también discrepancias entre las cantidades mediadas y los datos experimentales reportados en la literatura.

Concretamente nos referimos al número de lesiones que se dan en el material genético. La simulación computacional nos da acceso a el número exacto de lesiones con lujo de detalles, tanto la base par y hebra específica del plásmido en la que se produjo la lesión, como el radical libre que la causo. Esta información es claramente imposible de obtener experimentalmente y tanto Tomita H. et al (1995) como autores posteriores; por ejemplo, Edel S., Terrissol M., et al 2006, nos hablan de que en un experimento real se debe inferir el número de rompimientos a partir de la cantidad de segmentos de ADN observables.

Remitiéndonos al experimento de Tomita él ocupa la técnica de electroforesis en gel, en el que se ocupa un campo eléctrico para separar por tamaño los fragmentos de ADN producidos después de la irradiación de sus muestras. Al ser sometidos a la fuerza del campo eléctrico, el material genético se *parte* en segmentos con los que se puede calcular los rompimientos simples y dobles, pero esto abre la pregunta en la simulación computación de *¿Qué cuenta como un segmento?* Para este trabajo en específico consideramos diferentes configuraciones y encontramos, que las lesiones en hebras

opuestas a menos de 350 bases pares como definición para los segmentos, produjo que los resultados estuvieran en concordancia con los datos experimentales.

Los resultados finales para el número de rompimientos simples y para segmentos de ADN se muestran abajo comparados con los datos experimentales obtenidos por H. Tomita, Kai M., et al en 1995 en un rango de temperaturas mayor a 20°C ya que es el rango en los nuestros modelos químicos tienen certeza.

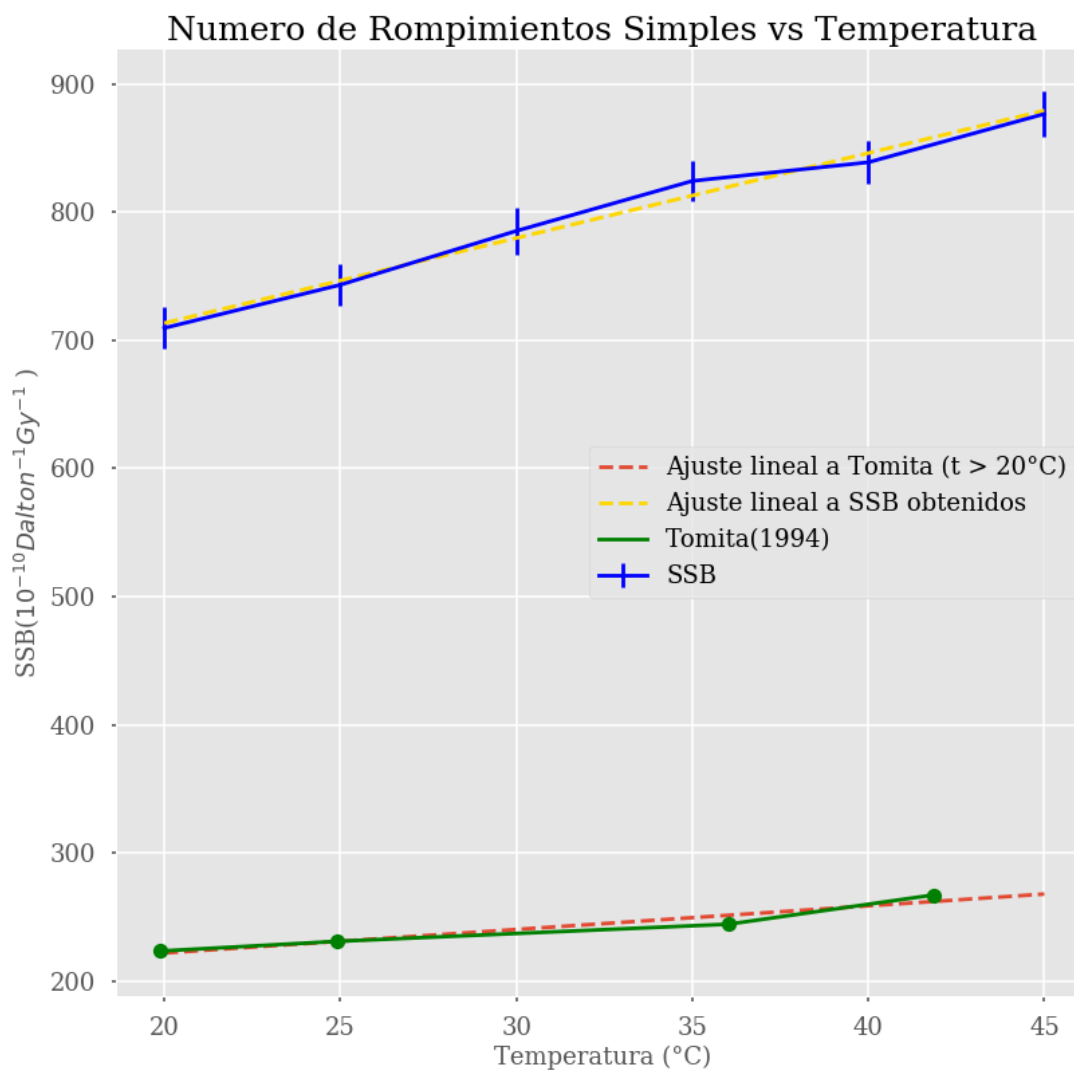


Imagen 3.8. Número de rompimientos simples en función de la temperatura normalizado respecto al número de total de plásmidos suspendidos en una solución acuosa, y comparados con el número de rompimientos simples reportados en Tomita H. et al (1995).

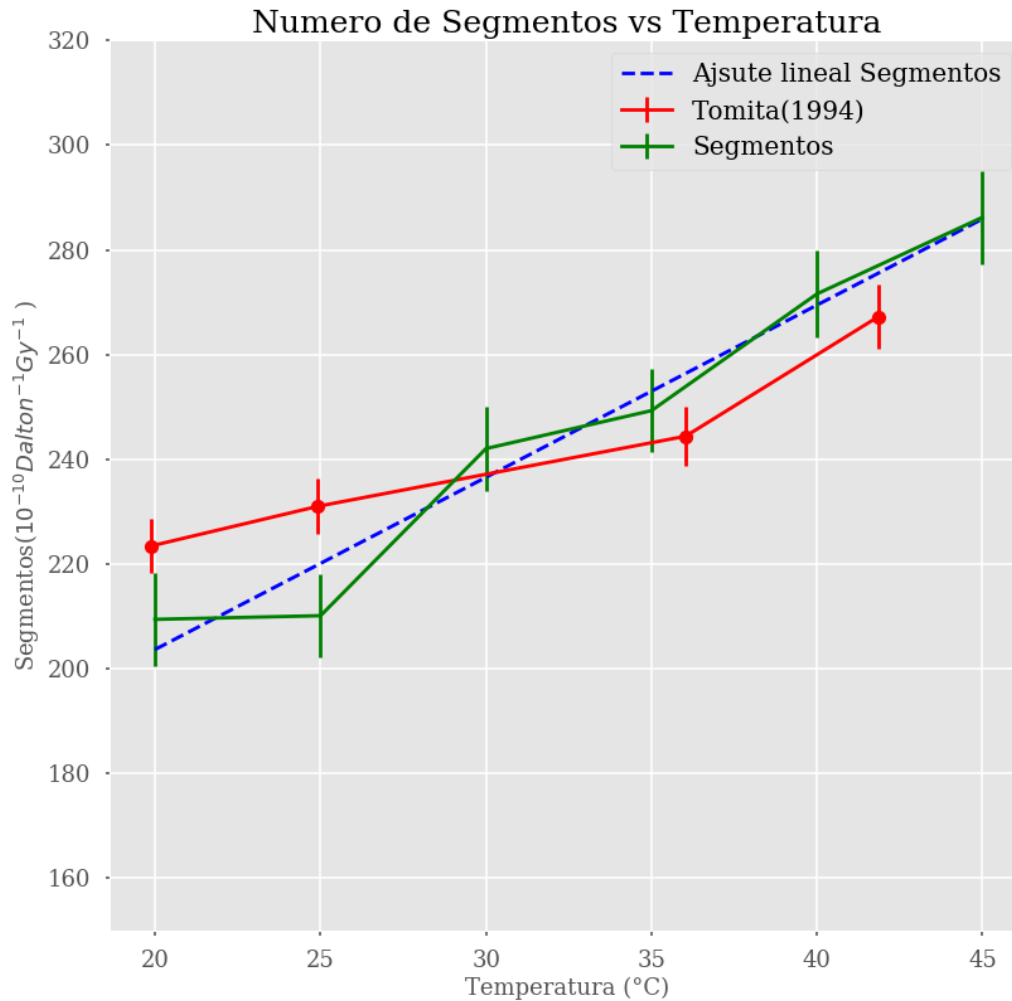


Imagen 3.9. Número de segmentos en función de la temperatura normalizado respecto al número de total de plásmidos suspendidos en una solución acuosa y comparados con el número de rompimientos simples reportados en Tomita H. et al (1995).

Se hizo un ajuste lineal tanto para los resultados obtenidos como para los datos experimentales de Tomita (1995) en el rango estudiado (0-45°C), los resultados para cada ajuste lineal están dados por las siguientes rectas.

Para los rompimientos simples obtenidos a través de la simulación computacional, el mejor ajuste lineal esta dado por:

$$SSB(t) \approx 6.639 \cdot t + 581.193$$

Para los segmentos, el mejor ajuste lineal esta dado por:

$$\text{Seg}(t) = 3.288 \cdot t + 137.913$$

Y para los datos experimentales por:

$$SSB(t)_{Exp} \approx 1.841 \cdot t + 185.061$$

A continuación, se presentan los resultados para rompimientos dobles que cuentan con una definición más estricta: son aquellas lesiones en hebras opuestas a menos de diez bases pares de distancia:

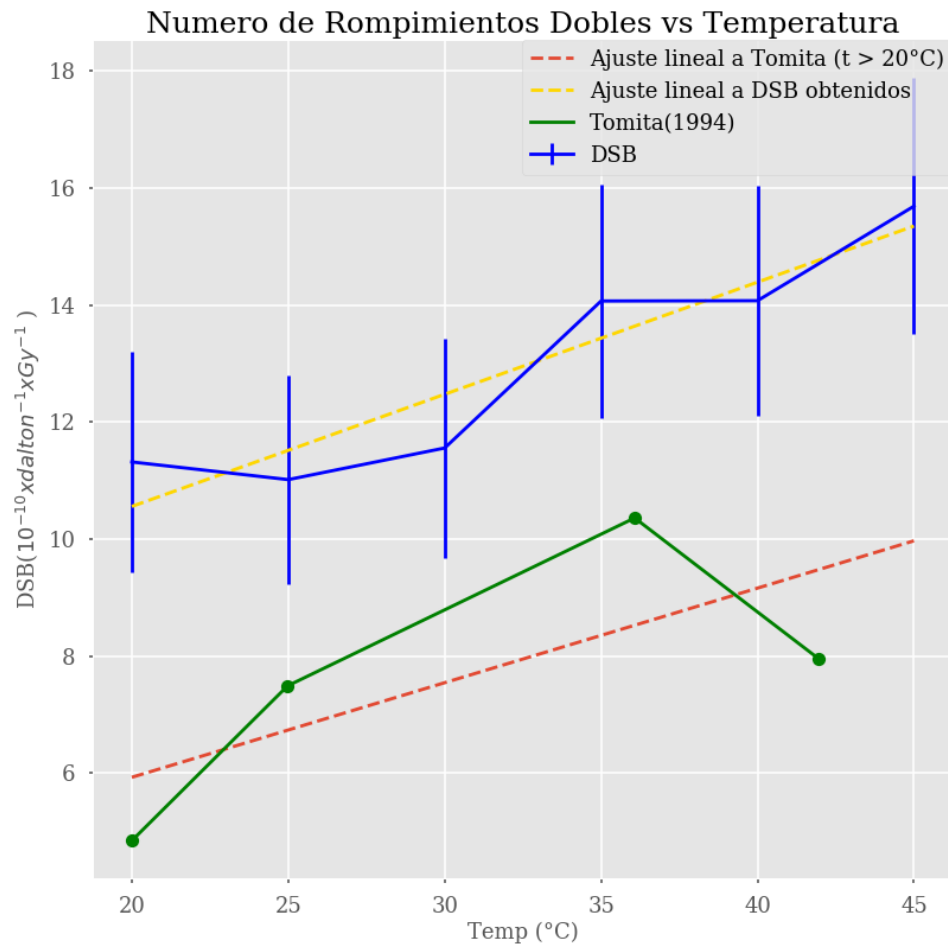


Imagen 3.9: número de rompimientos dobles en función de la temperatura normalizado respecto al número de total de plásmidos suspendidos en una solución acuosa. y comparados con el número de rompimientos simples reportados en Tomita H. et al (1995).

De igual manera podemos presentar los ajustes para los rompimientos dobles obtenidos, en este caso el mejor ajuste lineal para los datos simulados este dado por:

$$DSB(t) \approx 0.191 \cdot t + 6.725$$

Y para los datos experimentales por:

$$DSB(t)_{Exp} \approx 0.161 \cdot t + 2.697$$

Los resultados de esta sección y una revisión general de toda la metodología se presentarán en el siguiente capítulo, en ella discutiremos la validez y el significado de estos resultados y se propondrá una metodología alternativa para mejorarlos cuando sea posible o una explicación de las posibles fuentes de disparidad entre nuestros resultados y los datos experimentales.

Capítulo 4 Discusión

En este capítulo revisaremos cada uno de los puntos planteados en el trabajo realizado y se hará una síntesis de la discusión que se tuvo en cuanto al significado que hay detrás de cada uno de ellos, intentando cubrir los aciertos y las fallas en nuestra metodología y resultados para finalmente proponer a futuro alternativas para obtener mejores resultados o para extender el trabajo de investigación.

4.1 Resultados de la Implementación de los Modelos Químicos y Valores G

En primer lugar, al revisar el nuestro primer objetivo de implementar los modelos químicos propuestos para el escalamiento de los parámetros que rigen a las reacciones químicas entre las especies radiolíticas podemos decir que cumplimos de manera exitosa nuestro cometido.

Este enunciado se respalda al observar los resultados para los valores G en función de la temperatura. Como podemos ver en la figura (3.3) del capítulo anterior, los valores G calculados siguieron la tendencia a aumentar a medida que la temperatura aumenta, observada en los datos experimentales.

También podemos decir que se verificó la implementación al cumplirse la ecuación de balance para las simulaciones, tanto para la evolución temporal como para su dependencia respecto a la temperatura de los valores G. Entonces, existe consistencia en nuestras simulaciones al no violar en ningún momento la conservación de la materia.

Podemos revisar el caso concreto de la evolución temporal de la cantidad de OH comparada con la del peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Debido a que la principal reacción que las involucra es la **R3**: $\text{OH} + \text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$, esta nos indica que la principal fuente de peróxido de hidrogeno se da al reaccionar el hidroxilo consigo mismo. Al ver la evolución temporal de ambas especies, podemos ver que son casi complementarias. Es decir, a pesar de que imaginar el mecanismo de interacción entre especies químicas completo es muy difícil, podemos decir que el hidroxilo *primario* que se produce después de la irradiación del medio empieza a decaer una vez que empieza a reaccionar con las otras especies químicas disueltas. Por otra parte, el valor G del peróxido de hidrogeno aumenta a medida que avanza el tiempo; y esto se debe precisamente a que es el producto de la reacción $\text{OH} + \text{OH}$. Esto se observó para todas las temperaturas estudiadas.

Al discutir los resultados obtenidos para los valores G en función de la temperatura podemos observar que estos siguen hasta un grado satisfactorio la tendencia de los datos experimentales y de los ajustes propuestos por Elliot & Barts (2008). Sin embargo, es evidente que existen discrepancias entre ellos. La concordancia fue razonable a pesar de se comparan simulaciones en agua líquida con experimentos en presencia de solventes. Una validación extensiva, requiere de incluir en la simulación las concentraciones y tasa de reacción de cada solvente usado en un experimento en particular. Esta tarea

está fuera del alcance de esta tesis, sin embargo, se desarrolló la herramienta que servirá para esa tarea. Una metodología de comparación propuesta en este trabajo es el considerar los tiempos en los que pudieran haberse recuperado los valores G mediante la concentración de bicarbonato usada para cada experimento. Al observar los tiempos para cada uno de los datos, es obvio que no son exactamente a 10^6 ps como comúnmente se reporta en estudios Monte Carlo [Shin et al, Ramos-Mendez et al 2019], sino que los valores experimentales no solo abarcan cierto rango temporal. Algunos son anteriores a este punto en el que el medio se vuelve estable y otros son posteriores, es decir, recuperados en la etapa de química homogénea. Esto indica que los modelos propuestos se construyeron a partir de datos experimentales en un intervalo de confianza *generoso*, lo que naturalmente provocaría diferencias entre nuestra implementación y los experimentos generales. Sin embargo, la comparación se realizó para observar la tendencia con de los datos con la temperatura, y esta fue correcta.

De esta sección podemos concluir que, a pesar de las diferencias entre los datos experimentales y los resultados computacionales, se encuentran dentro de un intervalo de confianza aceptable. Como en todo modelo se debe hacer un compromiso con las limitaciones para representar todas las variables involucradas en un fenómeno, algunas de ellas con incertidumbre implícitas no reportadas claramente en la literatura. Se deben reconocer las limitaciones tecnológicas que existen en el método experimental que se ocupó al tiempo de recabar datos. Desafortunadamente, no existe una actualización de datos en función de la temperatura para agua pura.

4.2 Resultados para el daño indirecto al ADN

Al discutir los resultados para las simulaciones podemos mencionar que, aunque claramente existen diferencias significativas entre los resultados, sobre todo para las lesiones simples (SSB), la tendencia del número de rompimientos reportados es a aumentar a medida que la temperatura crece, esto es indicativo de que el aspecto físico químico de la hipertermia ciertamente tiene una contribución en el daño biológico producido por radiación, esto se puede deber en gran parte a que la producción de OH en el medio acuoso por el efecto de la radiolisis también aumenta con la temperatura, esto se ve reflejado en los resultados previos para los valores G de las especies químicas notables, por lo que en este sentido podemos decir que se ha cumplido con el objetivo general del trabajo de tesis.

Por otra parte, podemos retomar la discusión iniciada en la sección del capítulo pasado dedicada a reportar los resultados obtenidos desde nuestra simulación: a pesar de que los métodos computacionales sean una herramienta poderosa para la investigación científica, la ventana que abren para medir con lujo de detalle cantidades que no están disponibles en un experimento pudiera parecer una ventaja al principio, pero al no tener un equivalente directo con mediciones que fueron obtenidas de manera indirecta hace que sea confuso y complicado el comparar de manera justa o adecuada los datos generados por una simulación y los datos experimentales disponibles.

En la última fase de la investigación sin embargo se encontró en la literatura material que respalda definiciones más concretas que se podrían utilizar para resolver esta ambigüedad: en “Computer

Simulation of Strand Break Yields in Plasmid PBR322: DNA Damage Following ^{125}I Decay” de S. por Edel, M. Terrissol et al (2006) adoptan una definición más rígida pero menos directa de como contabilizar las lesiones, clasificando a los rompimientos en el ADN no como SSB o DSB sino como eventos de relajación (RE) y de linealización (LE) que tiene que ver con cómo se destensan los fragmentos de ADN después de que ocurren lesiones en él, posteriormente el número de estos eventos se usa para calcular indirectamente el número de rompimientos simples y dobles de la muestra, lo interesante de esta aproximación es que podría reconciliar de una mejor manera nuestros resultados con los datos reportados en la literatura ya que estos eventos si son detectables experimentalmente. Sin embargo, debido a las constricciones en el tiempo no nos fue posible implementar este modelo, pero es interesante plantear la posibilidad de que en un trabajo futuro este se pueda utilizar no solamente para nuestra investigación sino para subsecuentes aplicaciones relacionadas.

4.3 Trabajo Futuro

Como se explicó en la sección anterior el principal problema a resolver es utilizar una mejor clasificación para reportar las lesiones al ADN que refleje de manera más certera las condiciones experimentales que deseamos recrear, sin embargo, también se pueden mejorar en distintos ámbitos nuestra investigación. Por ejemplo, uno de los compromisos más delicados que se hace en este tipo de estudios para simplificar la simulación es aproximar el medio celular a agua puro o a alguna solución acuosa con una concentración de solventes determinada, sin embargo, este modelo es limitado ya que el verdadero ambiente celular este compuesto de proteínas, lípidos, nutrientes etc. Esto quiere decir que las simulaciones que se hacen con esta aproximación no toman en cuenta factores como la capacidad de solvencia del medio celular a radicales libres, átomos de hidrógeno y electrones solvatados, o los productos resultantes de reacciones de primer orden.

En el desarrollo de un modelo mecanístico, la implementación de muchos de estos parámetros no es trivial. Esto se debe a que, en la literatura, existe una amplia gama de valores para los coeficientes de reacción, difusión y productos que difieren para diversas condiciones del entorno celular (Neta P., Huie Robert E. & Ross A. B., 1989, Radi R., 2018, Labarbe R., Hotoiu L., et al, 2020, Wardman P., 2020).

Una línea de investigación derivada de este trabajo inicial puede ser el desarrollo de un modelo para el medio celular más robusto, resultado de la recopilación extenuante de información bioquímica disponible en la literatura que también pueda ser implementado en los softwares de simulación computacional basados en Monte Carlo Track Structure de código abierto para mantenernos en la filosofía de que estas herramientas sean de fácil acceso a la comunidad científica y que el desarrollo de las mismas sea un esfuerzo colectivo.

Bibliografía

- Kaur, P., Hurwitz, M. D., Krishnan, S., & Asea, A. (2011). Combined hyperthermia and radiotherapy for the treatment of cancer. *Cancers*, 3(4), 3799–3823. <https://doi.org/10.3390/cancers3043799>
- Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(5), 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- El-Awady, R. A., Dikomey, E., & Dahm-Daphi, J. (2001). Heat effects on DNA repair after ionising radiation: hyperthermia commonly increases the number of non-repaired double-strand breaks and structural rearrangements. *Nucleic acids research*, 29(9), 1960–1966. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.1960>
- Tomita, H., Kai, M., Kusama, T., & Ito, A. (1997). Monte Carlo simulation of physicochemical processes of liquid water radiolysis. The effects of dissolved oxygen and OH scavenger. *Radiation and environmental biophysics*, 36(2), 105–116. <https://doi.org/10.1007/s004110050061>
- Aldaco Servide F., Pérez Pérez P., Cervantes Sánchez G., Torrecillas Torres L., Erazo A. (2012) Mortalidad por cáncer en México 2000-2010: el recuento de los daños. *Gaceta mexicana de oncología*.
- Tsai Ju-Ying, Chen Fang-Hsin, Hsieh Tsung-Yu, Hsiao Ya-Yun. (2015). Effects of indirect actions and oxygen on relative biological effectiveness: Estimate of DSB induction and conversion induced by gamma rays and helium ions. *Journal of radiation research*. 56. 10.1093/jrr/rrv025.
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences*, 9(3), 193–199. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>
- McMahon S. & Prise K. (2019). Mechanistic Modelling of Radiation Responses. *Cancers*. 11. 205. [10.3390/cancers11020205](https://doi.org/10.3390/cancers11020205).
- Vignard, J., Mirey, G., & Salles, B. (2013). Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up. *Radiotherapy and oncology. Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 108(3), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.013>
- Desouky O., Ding N., Zhou G. (2015). Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J Radiat Res Appl Sci*. 8(2):247–254.
- Oei, A. L., Vriend, L. E., Crezee, J., Franken, N. A., & Krawczyk, P. M. (2015). Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all. *Radiation oncology (London, England)*, 10, 165. <https://doi.org/10.1186/s13014-015-0462-0>
- Datta, N. R., & Bodis, S. (2019). Hyperthermia with radiotherapy reduces tumour alpha/beta: Insights from trials of thermoradiotherapy vs radiotherapy alone. *Radiotherapy and oncology*:

journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 138, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.05.002>

Almeida, K. H., & Sobol, R. W. (2007). A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA repair*, 6(6), 695–711.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.01.009>

Furusawa Y., Fukutsu K., Aoki M., Itsukaichi H., Eguchi-Kasai K., Ohara H., Yatagai F., Kanai T. and Ando K. (2000). Inactivation of aerobic and hypoxic cells from three different cell lines by accelerated (3) He-, (12)C- and (20) Ne-ion beams. *Radiat. Res.* 154 485–96

Klimczak, U., Ludwig, D. C., Mark, F., Rettberg, P., & Schulte-Frohlinde, D. (1993). Irradiation of plasmid and phage DNA in water-alcohol mixtures: strand breaks and lethal damage as a function of scavenger concentration. *International journal of radiation biology*, 64(5), 497–510.
<https://doi.org/10.1080/09553009314551711>

The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP publication 103. *Ann ICRP*. 2007;37(2-4):1-332. doi: 10.1016/j.icrp.2007.10.003. PMID: 18082557.

Andreo P., Burns D.T., Nahum A.E., Seuntjens J., Attix F.H. (2017) *Fundamentals of Ionizing Radiation Dosimetry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2017. 957. pp. *Med. Phys.*, 45: 5353-5354.
<https://doi.org/10.1002/mp.13164>

Y. Frongillo, T. Goulet, M.-J. Fraser, V. Cobut, J. P. Patau and J.-P. Jay-Gerin (1998). Monte Carlo Simulation of Fast Electron and Proton Tracks in Liquid Water II - Nonhomogeneous Chemistry, *Radiat. Phys. Chem.*, 51, 245.

Meylan, Sylvain & Vimont, U. & Incerti, Sebastien & Clairand, Isabelle & Villagrasa, C. (2016). Geant4-DNA simulations using complex DNA geometries generated by the DnaFabric tool. *Computer Physics Communications*. 204. 10.1016/j.cpc.2016.02.019. Nikjoo H. et al (2006) Track-structure codes in radiation research. *ScienceDirect*

McNamara A.L., Ramos-Méndez J., Perl J., Held K., Dominguez N., Moreno. E., Henthorn N.T., Kirkby K.J., Meylan S., Villagrasa C., Incerti S., Faddegon B., Paganetti H., Schuemann J. (2018) Geometrical structures for radiation biology research as implemented in the TOPAS-nBio toolkit. *Phys Med Biol*. 2018 Sep 6;63(17):175018. doi: 10.1088/1361-6560/aad8eb. PMID: 30088810; PMCID: PMC6176684.

Ramos-Méndez, J., Perl, J., Schuemann, J., McNamara, A., Paganetti, H., & Faddegon, B. (2018). Monte Carlo simulation of chemistry following radiolysis with TOPAS-nBio. *Physics in medicine and biology*, 63(10), 105014. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/aac04c>

Schuemann, J., McNamara, A. L., Ramos-Méndez, J., Perl, J., Held, K. D., Paganetti, H., Incerti, S., & Faddegon, B. (2019). TOPAS-nBio: An Extension to the TOPAS Simulation Toolkit for Cellular and Sub-cellular Radiobiology. *Radiation research*, 191(2), 125–138.
<https://doi.org/10.1667/RR15226.1>

Tomita, H., Kai, M., Kusama, T., & Aoki, Y. (1995). Strand break formation in plasmid DNA irradiated in aqueous solution: effect of medium temperature and hydroxyl radical scavenger concentration. *Journal of radiation research*, 36(1), 46–55. <https://doi.org/10.1269/jrr.36.46>

Plante I. (2011). A Monte-Carlo step-by-step simulation code of the non-homogeneous chemistry of the radiolysis of water and aqueous solutions. Part I: theoretical framework and implementation. *Radiation and environmental biophysics*, 50(3), 389–403. <https://doi.org/10.1007/s00411-011-0367-8>

Plante I. & Devroye L. (2017). Considerations for the independent reaction times and step-by-step methods for radiation chemistry simulations. *Radiation Physics and Chemistry*. 139. [10.1016/j.radphyschem.2017.03.021](https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2017.03.021).

N. J. B. Green, M. J. Pilling, S. M. Pimblott, and P. Clifford (1990) Stochastic Modeling of Fast Kinetics in a Radiation Track. *The Journal of Physical Chemistry* 1990 94 (1), 251-258. DOI: [10.1021/j100364a041](https://doi.org/10.1021/j100364a041)

Nikjoo, H., Uehara, S., & Emfietzoglou, D. (2012). *Interaction of Radiation with Matter*. Boca Raton: CRC Press. [10.1201/b12109](https://doi.org/10.1201/b12109).

Bielajew, A. F. (2016). Fundamentals of the Monte Carlo method for neutral and charged particle transport. *SciencesNew York*, 1–338.

Incerti S, Baldacchino G, Bernal M, Capra R, Champion C, Francis Z, Guèye P, Mantero A, Mascialino B, Moretto P, Nieminen P, Villagrasa C and Zacharatou C (2010a). THE Geant4-DNA project *Int. J. Model. Simulation, Sci. Comput.* 1 157–78

Incerti S, Ivanchenko A, Karamitros M, Mantero A, Moretto P, Tran H N, Mascialino B, Champion C, Ivanchenko V N, Bernal M a, Francis Z, Villagrasa C, Baldacchin G, Guèye P, Capra R, Nieminen P and Zacharatou C (2010b). Comparison of GEANT4 very low energy cross section models with experimental data in water. *Med. Phys.* 37 4692–708

Incerti S, Kyriakou I, Bernal M A, Bordage M C, Francis Z, Guatelli S, Ivanchenko V, Karamitros M, Lampe N, Lee S B, Meylan S, Min C H, Shin W G, Nieminen P, Sakata D, Tang N, Villagrasa C, Tran H N and Brown J M C (2018) Geant4-DNA example applications for track structure simulations in liquid water: A report from the Geant4-DNA Project *Med. Phys.* 45 e722–39

Bernal M A, Bordage M C, Brown J M C, Davidková M, Delage E, El Bitar Z, Enger S A, Francis Z, Guatelli S, Ivanchenko V N, Karamitros M, Kyriakou I, Maigne L, Meylan S, Murakami K, Okada S, Payno H, Perrot Y, Petrovic I, Pham Q T, Ristic-Fira A, Sasaki T, Štěpán V, Tran H N, Villagrasa C and Incerti S (2015). Track structure modeling in liquid water: A review of the Geant4-DNA very low energy extension of the Geant4 Monte Carlo simulation toolkit. *Phys. Med.* 31 861–74

Karamitros M, Mantero A, Incerti S, Friedland W, Baldacchino G, Barberet P, Bernal M, Capra R, Champion C, El Bitar Z, Francis Z, Gueye P, Ivanchenko A, Ivanchenko V, Kurashige H,

Mascialino B, Moretto P, Nieminen P, Santin G, Seznec H, Tran H N, Villagrasa C and Zacharatou C (2011). Modeling Radiation Chemistry in the Geant4 Toolkit Prog. Nucl. Sci. Technol. 2 503–8

Kreipl M S, Friedland W and Paretzke H G (2009). Time- and space-resolved Monte Carlo study of water radiolysis for photon, electron and ion irradiation Radiat. Environ. Biophys. 48 11–20

Shin W-G, Ramos-Mendez J, Faddegon B, Tran H N, Villagrasa C, Perrot Y, Okada S, Karamitros M, Emfietzoglou D, Kyriakou I, Bordage M C, Sakata D, Guatelli S, Choi H J, Min C H, Lee S B and Incerti S. (2019). Evaluation of the influence of physical and chemical parameters on water radiolysis simulations under MeV electron irradiation using Geant4-DNA J. Appl. Phys. 126 114301

Le Caër S. (2011). Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. Water. 3. 10.3390/w3010235.

LaVerne, J. A., & Pimblott, S. M. (1993). Yields of hydroxyl radical and hydrated electron scavenging reactions in aqueous solutions of biological interest. Radiation research, 135(1), 16–23.

Hervé du Penhoat M-A., Goulet T., Frongillo Y., Fraser M-J., Bernat P., and Jay-Gerin.J-P (2000) The Journal of Physical Chemistry A 2000 104 (50), 11757-11770 DOI: 10.1021/jp001662d

Elliot, A.J., & Bartels, D.M. (2009). The reaction set, rate constants and g-values for the simulation of the radiolysis of light water over the range 20 deg to 350 deg C based on information available in 2008 (AECL--153-127160-450-001). Canada