



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Estudio del comportamiento de supervivencia in vitro de células SiHa irradiadas con una fuente de Ir-192 de BQT-HDR

Andrei Enrique Jaimes Motta

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Física
Bogotá, Colombia
2023

Estudio del comportamiento de supervivencia in vitro de células SiHa irradiadas con una fuente de Ir-192 de BQT-HDR

Andrei Enrique Jaimes Motta

Trabajo final de maestría presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Física Médica

Directora:

M.Sc. Yudy Alexandra Pabón Girón

Codirectora:

Ph.D y P.D María Cristina Plazas

Asesora:

M.Sc. Josefa Antonia Rodríguez García

Línea de Investigación:

Radiobiología

Grupos de Investigación:

Grupo de Física Médica de la Universidad Nacional de Colombia

Grupo Biología del Cancer del Instituto Nacional de Cancerología E.S.E

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Física
Bogotá, Colombia
2023

**Estudio del comportamiento de supervivencia in vitro
de células SiHa irradiadas con una fuente de Ir-192 de
BQT-HDR**

M.Sc. Yudy Alexandra Pabón Girón
Directora

Ph.D y P.D María Cristina Palzas
Codirectora

M.Sc. Josefa Antonia Rodríguez García
Asesora

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Física
Bogotá, Colombia
2023

Dedicado

A mi familia, profesores y amigos.

Agradecimientos

El resultado de este trabajo y de estos años de estudio se lo dedico a las personas más importantes de mi vida, mi familia, mi madre Cecilia Motta, mi padre Nestor Jaimes, mis hermanos Dibari y Jordi, gracias por su amor, apoyo en este proceso.

Agradezco profundamente a mi profesora y directora Alexandra Pabón y a mi co-directora y profesora Maria Cristina Plazas, gracias por creer y confiar en mi aún cuando yo no lo hacía. Gracias a la profesora Josefa Rodriguez , a mi compañero de radioterapia Rafael Chona y a Vanessa Mejia quienes fueron fundamentales en el desarrollo de este trabajo sin ustedes no hubiera podido.

Agradecimientos siempre a mis amigos físicos, Brayan, Yensur y Ferney por siempre tener el tiempo para discutir temas y resolver dudas.

Muchas gracias también a mis amigos de toda la vida Sergio León y Sebastian Florez, por ser mi apoyo y soporte en los buenos y malos momentos, que la vida nos permita seguir siendo amigos para siempre. Gracias a Angela por el apoyo en esta recta final, eternamente agradecido.

Finalmente pero no menos importante, agradecimientos infinitos al Instituto Nacional de Cancerología por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones y a mis profesores que allí trabajan por enseñarme sobre este maravilloso mundo de la Física Médica y la radioterapia.

Resumen

Estudio del comportamiento de supervivencia in vitro de células SiHa irradiadas con una fuente de Ir-192 de BQT-HDR.

En el presente trabajo se evaluó la supervivencia de la línea celular SiHa al ser irradiada con una fuente radiactiva de Iridio 192 (Ir-192), para esto se planteó y desarrolló la siguiente metodología. En la primera fase se realizaron los controles de calidad asociados a la actividad de la fuente, los tiempos de tránsito y la verificación de la dosis a entregar. Se verificó la actividad de la fuente obteniendo un error del 0.9104 % y el tiempo de tránsito con un error de 3.15 %, además de verificar y corregir una subdosificación del 15 % de la dosis al momento de irradiar los cultivos celulares. En la segunda fase de la metodología se obtuvo una curva de supervivencia celular a partir del ensayo por MTT, para diferentes dosis irradiadas, obteniendo un comportamiento exponencial decreciente acorde a lo mostrado en la literatura; se realizaron también ensayos clonogénicos para determinar la fracción de supervivencia de las células, pero los resultados no fueron concluyentes. En la tercera y última fase se irradiaron cultivos celulares con dos de los esquemas de irradiación más usados en los procedimientos de braquiterapia del Instituto Nacional de Cancerología. El Esquema 1 con dosis de 5.5 Gy en 5 fracciones y el Esquema 2 con dosis de 7 Gy en 4 fracciones, obteniendo una menor supervivencia celular con el Esquema 2

Palabras clave: Braquiterapia, técnicas in vitro, cultivo celular, radiación ionizante..

Abstract

Study of the in vitro survival behavior of SiHa cells irradiated with an Ir-192 source of BQT-HDR

In the present work, the survival of the SiHa cell line when irradiated with a radioactive source of Iridium 192 (Ir-192) was evaluated, for which the following methodology was proposed and developed. In the first phase, quality controls associated with the activity of the source, transit times and verification of the dose to be delivered were carried out. The activity of the source was verified, obtaining an error of 0.9104 % and the transit time with an error of 3.15 %, in addition to verifying and correcting an underdosage of 15 % of the dose at the time of irradiating the Cell cultures. In the second phase of the methodology, a cell survival curve was obtained from the MTT assay, for different irradiated doses, obtaining a decreasing exponential behavior according to what is shown in the literature; clonogenic assays were also performed to determine the survival fraction of the cells, but the results were inconclusive. In the third and final phase, cell cultures were irradiated with two of the most widely used irradiation schemes in brachytherapy procedures at the National Institute

of Cancerology. Scheme 1 with a dose of 5.5 Gy in 5 fractions and Scheme 2 with a dose of 7 Gy in 4 fractions, obtaining a lower cell survival with Scheme 2.

Keywords: Brachytherapy, in vitro techniques, cell culture, radiation

Contenido

Agradecimientos	VII
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	1
1. Introducción	2
2. Marco teórico	4
2.1. Radiación Ionizante	4
2.2. Equipo de carga diferida remota.	6
2.3. Fuente de Ir-192	6
2.4. Cámaras de Ionización	8
2.5. Electrómetro	9
2.6. Películas Radiocrómicas	10
2.7. Línea celular	10
2.8. Efecto de la radiación en la célula	11
2.9. Modelo Lineal Cuadrático	14
2.10. Ensayos supervivencia celular	15
2.10.1. Ensayo por MTT	15
2.10.2. Ensayo Clonogénico	16
3. Materiales y metodología	18
3.1. Controles de Calidad	18
3.1.1. Verificación de la actividad de la fuente	18
3.1.2. Tiempo de tránsito.	20
3.1.3. Verificación de la dosis entregada.	21
3.2. Sembrado e irradiación de cultivos celulares	23
3.3. Supervivencia celular	24
4. Resultados y análisis de datos	27
4.1. Controles de calidad de la fuente y verificación de la dosis a entregar	27
4.2. Cultivos celulares, irradiación y curva de supervivencia celular	32

4.3. Supervivencia celular dosis fraccionada	35
5. Conclusiones y discusión	42
A. Anexo: Mediciones de la verificación de la actividad de la fuente	44
B. Anexo: Mediciones de los tiempos estacionarios y tiempos de tránsito de la fuente	45
C. Anexo: Resultados del análisis de todos los ensayos en cada uno de los días correspondientes.	47
D. Anexo: Resultados del ensayo clonogénico	50
E. Anexo: Consideraciones éticas	53
Bibliografía	54

Lista de Figuras

2-1. Clasificación radiación ionizante. Imagen modificada de [1].	5
2-2. Equipo HDR GammaMed plus iX de carga diferida del Instituto Nacional de Cancerología.	6
2-3. Esquema de decaimineto reducido del Iridio-192 en Platino-192 a través de de- caimiento β^- y en Osmio-192 a través de decaimiento por captura electrónica [1].	7
2-4. Diseño y dimensiones de fuente Ir-192 para robot GammaMedplus iX [2]. . .	7
2-5. Esquema y cámara de ionización cilíndrica tipo farmer [3].	8
2-6. Esquema y cámara de ionización tipo pozo [4].	9
2-7. Electrómetro UNIDOS E de la marca PTW®. Dispone de un selector de valores de tensión en pasos discretos y también de cambio de polaridad. . . .	9
2-8. Esquema de la estructura de la PR EBT3 [5].	10
2-9. Etapas de la interacción de la radiación ionizante con un medio acuoso (ra- diólisis del agua). Imagen tomada de [6].	12
2-10. Acción directa y acción indirecta de la radiación ionizante sobre la célula. Imagen tomada de [7].	13
2-11. Posibles daños en la cadena de ADN producto de la radiación ionizante. Ima- gen tomada de [6].	13
2-12. Modelo lineal cuadrático basado en la curva de supervivencia celular. Imagen modificada de [6].	14
2-13. Representación gráfica del ensayo por MTT. De derecha a izqueirda se apre- cia como la tonalidad púrpura disminuye, lo que indica una reducción de la supervivencia de las células [8].	16
3-1. Montaje experimental para la verificación de la actividad de la fuente. En la imagen se muestra el robot GammaMed Plus iX, la cámara de pozo que esta conectada al robot mediante un tubo de tranferencia por donde va la fuente y esta a su vez conectada a un electrómetro para medir las cargas colectadas. Se sujeta el tubo de tranferencia a la camilla con el fin de que este llegue de manera perpendicular a la cámara y evitar posibles obstrucciones de la fuente.	19
3-2. Montaje experimental para la verificación del tiempo de tránsito. Se muestra el tandem que a su vez esta conectado al tubo de tranferencia y este al robot.	20

3-3. Sistema construido y utilizado para la irradiación de películas radiocrómicas y de cultivos celulares. En la imagen se muestra el sistema de parafina y la película, junto con la tomografía hecha al sistema de irradiación y la planeación del cálculo de dosis que se hizo a partir de dicha tomografía.	22
3-4. Diferentes sistemas de configuración para irradiar y corroborar la dosis entregada. De izquierda a derecha, película radiocrómica únicamente, película dentro del matraz, y película dentro del matraz con agua.	22
3-5. Configuración de los cultivos celulares irradiados en los matraces y del posterior sembrado celular en la placa de 96 pozos.	23
3-6. Fotos tomadas sembrando los cultivos celulares en el laboratorio de Biología del Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología.	24
3-7. Captura de imagen de la planeación de la dosis de tratamiento que se entregará al cultivo celular, realizada en el software Eclipse de Varian (®).	25
3-8. Configuración de los cultivos celulares irradiados en los matraces y del posterior sembrado celular en la placa de 96 pozos.	25
4-1. Tiempo estacionario Vs tiempo efectivo. Regresión lineal para determinar el tiempo de transito de la fuente.	28
4-2. Lectura de la película radiocrómica irradiada con la primera configuración (placa sola).	29
4-3. Lectura de la película radiocrómica irradiada con la segunda configuración (placa dentro del matraz).	30
4-4. Lectura de la película radiocrómica irradiada con la tercera configuración (placa dentro del matraz con agua).	31
4-5. Re-escalamiento de la dosis en el software BrachyVison (®) buscando que la isodosis de 115 % cubra la region del CTV (en púrpura).	31
4-6. Lectura de la película radiocrómica irradiada con la tercera configuración después de reescalar la dosis. Se aprecia que entre el 100 % y el 95 % de la dosis cubre toda la película.	32
4-7. Montaje experimental utilizado para la irradiación de los cultivos celulares. En la imagen se ve el robot Gamma Med Plus iX que contiene la fuente, los tubos de transferencia, las agujas por donde pasa la fuente y la parafina utilizada para sostener las agujas y el matraz	33
4-8. Gráfica porcentaje de supervivencia celular respecto a las dosis para el análisis de todos los ensayos 24 horas después de la irradiación.	34
4-9. Gráfica porcentaje de supervivencia celular respecto a las dosis para el análisis de todos los ensayos 4 días después de la irradiación.	35
4-10. Gráfica porcentaje de supervivencia celular respecto a las dosis para el análisis de todos los ensayos 7 días después de la irradiación.	35

4-11. Gráfica en escala semi-logarítmica de la supervivencia celular respecto a las dosis, para todos los ensayos 7 días después de la irradiación.	36
4-12. Fotos tomadas a los grupos de control de varios ensayos. Se puede ver una morfología normal según lo reportando en la literatura y un distribución uniforme siempre buscando los espacios libres para multiplicarse.	37
4-13. Fotos tomadas a los cultivos celulares después de cada uno de los días de irradiación para el Esquema 1. a) día 1, b) día 3, c) día 5, d) día 8 y e) día 10. De izquierda a derecha aumentan los días y la dosis acumulada.	38
4-14. Fotos tomadas a los cultivos celualres después de cada uno de los días de irradiación para la fraccion 2. a) día 1, b) día 3, c) día 5 y d) día 8. De izquierda a derecha aumentan los días y la dosis acumulada.	39
4-15. Fotos tomadas al cultivo celular de control (izquierda) y al cultivo del esquema de irradiación 2 (derecha) después de aplicar el ensayo por MTT en el día 7 posterior a la última irradiación. Se muestran estas fotos para ejemplificar el ensayo por MTT.	40
C-1. Gráfica en escala lineal del porcentaje de supervivencia celular respecto a las dosis para el análisis de todos los ensayos 24 horas, 4 días y 7 días después de la irradiación.	47
C-2. Gráfica en escala semi-logarítmica del porcentaje de supervivencia celular respecto a las dosis para el análisis de todos los ensayos 24 horas, 4 días y 7 días después de la irradiación.	48
D-1. Fotos tomadas de diferentes cultivos celulares de control para el ensayo clonogénico.	50
D-2. Fotos tomadas de diferentes cultivos celulares irradiados con una dosis de 2 Gy para el ensayo clonogénico.	51
D-3. Fotos tomadas de diferentes cultivos celulares irradiados con una dosis de 4 Gy para el ensayo clonogénico.	51
D-4. Fotos tomadas de diferentes cultivos celulares irradiados con una dosis de 6 Gy para el ensayo clonogénico.	51
D-5. Fotos tomadas de diferentes cultivos celulares irradiados con una dosis de 8 Gy para el ensayo clonogénico.	51
D-6. Fotos tomadas de diferentes cultivos celulares irradiados con una dosis de 10 Gy para el ensayo clonogénico.	52

Lista de Tablas

4-1. Resultados de las lecturas de absorbancia para cada una de las dosis entregadas respecto al control de todos los ensayos el día 7 después de la irradiación. Estos valores de absorbancia se relacionan con la supervivencia celular. . . .	36
4-2. Resultados finales de la supervivencia celular para cada uno de los esquemas de irradiación con dosis fraccionadas diferentes. Los valores presentados son el promedio de los valores obtenidos en cada uno de los ensayos con su respectivo cálculo de incertidumbre.	40
A-1. Datos obtenidos de las mediciones de carga y corriente para la verificación de la actividad de la fuente. En rojo se resalta el punto máximo de lectura de la cámara de ionización.	44
B-1. Datos obtenidos de las mediciones de carga y corriente para los tiempos estacionarios, cuando la fuente esta en una posición fija.	45
B-2. Datos obtenidos de las mediciones de carga para la fuente en tránsito. Se resalta en azul claro los valores de tiempo efectivo, los cuales se obtienen de la razón entre las mediciones del tiempo en tránsito sobre el tiempo estacionario.	46
C-1. Resultados de las lecturas de absorbancia para cada una de las dosis entregadas respecto al control de todos los ensayos 24 horas después de la irradiación. Estos valores de absorbancia se relacionan con la supervivencia celular. . . .	48
C-2. Resultados de las lecturas de absorbancia para cada una de las dosis entregadas respecto al control de todos los ensayos 4 días después de la irradiación. Estos valores de absorbancia se relacionan con la supervivencia celular. . . .	49
D-1. Resultados de la fracción de supervivencia para los dos ensayos clonogénicos realizados. Se puede observar que los resultados obtenidos no son acordes a lo esperado según la literatura.	50

1. Introducción

La radioterapia como técnica terapéutica ofrece grandes beneficios en la lucha contra el cáncer, por lo cual es utilizada en aproximadamente el 50% de los casos de pacientes con este padecimiento [9]. Los tratamientos con radioterapia pueden ser de dos tipos: la teleterapia, que usa haces de radiación originados desde el exterior del cuerpo, dirigidos hacia la región del tumor y la braquiterapia que consiste en introducir material radiactivo dentro del tumor o sus alrededores utilizando diferentes aplicadores. La braquiterapia es una modalidad que suministra altas dosis de radiación dentro del volumen del tumor y presenta ventajas radiobiológicas en cuanto a tiempos y distancias de tratamiento cortas que minimizan la repoblación celular en tumores de rápido crecimiento [10]. Desde el punto de vista radiobiológico, la braquiterapia presenta grandes ventajas respecto a las terapias de haz externo y ya se han señalado sus posibles mejoras en los resultados clínicos [11]. En particular, la braquiterapia de alta tasa de dosis (HDR) ha sido seleccionada como un método preferible debido a su capacidad para tratar una amplia variedad de sitios clínicos [12], en particular juega un papel de gran importancia en el tratamiento de cáncer ginecológico [13], especialmente en el contexto colombiano, ya que según estudios recientes este es uno de los tipos de cáncer más comunes en las mujeres junto con el cáncer de mama [14, 15].

Desde aproximadamente tres décadas se han venido haciendo estudios de radiobiología relacionados con los efectos que la radiación puede tener sobre las células tumorales, y este hecho ha tomado gran relevancia, debido a que se descubrió la relación entre la radiosensibilidad de líneas celulares cultivadas in vitro y la respuesta del tipo correspondiente de los tumores in vivo [16].

Se han propuesto modelos radiobiológicos para investigar diferentes niveles de radiosensibilidad tumoral, por lo que los datos de los experimentos in vitro pueden identificar parámetros de radiosensibilidad que también pueden utilizarse para examinar la eficacia potencial de los nuevos diseños de planes de tratamiento hasta que se disponga de suficientes datos clínicos [17, 18]. En este contexto, un gran número de líneas celulares tumorales proporcionan la mayor parte de la información relativa a la respuesta celular tras la exposición a la radiación ionizante, cuyos efectos inducidos pueden ser investigados a través de muchos enfoques, permitiendo la identificación de la radioresistencia o la radiosensibilidad e incluso sus efectos sobre la proliferación y la supervivencia celular [19]. Existen varias líneas celulares que se utilizan en investigaciones de este tipo, y entre las más usadas esta la línea celular SiHa, la cual proviene del cáncer cérvicouterino que contiene el virus del papiloma humano subtipo 16 (VPH-16) [20].

Aunque se dispone de diferentes tipos de fuentes gamma para los procedimientos de braquiterapia, el Ir-192 es el isótopo más utilizado clínicamente, así como para los estudios de administración de dosis que garantizan la precisión dosimétrica de la braquiterapia HDR, reduciendo las incertidumbres y mejorando la optimización de la administración de dosis, sin perjuicio de las áreas en las que se está llevando a cabo un importante trabajo de desarrollo e investigación [21].

Con el interés de mostrar el impacto de la braquiterapia HDR a través del estudio de la supervivencia y la tasa de proliferación de la línea celular SiHa, además de poder observar cómo es su comportamiento al ser irradiadas con dosis semejantes a las que se entregan en los tratamientos de braquiterapia en el Instituto Nacional de Cancerología, este trabajo final de maestría plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la supervivencia de células SiHa irradiadas con una fuente de Ir-192 de BQT-HDR in vitro?

El presente trabajo se organiza de la siguiente manera: En la primera y segunda parte se presenta una introducción y un marco teórico con los conceptos necesarios para llevar a cabo la investigación. En la tercera parte se presenta los materiales o equipos, y la metodología implementada en el desarrollo de la investigación. En la cuarta parte se muestran los resultados obtenidos y el respectivo análisis. Finalmente, en la quinta parte de este trabajo se exponen las conclusiones y recomendaciones para futuros trabajos de investigación.

2. Marco teórico

2.1. Radiación Ionizante

La radiación es la propagación de energía en forma de ondas electromagnéticas o partículas subatómicas a través del vacío o de un medio material, la radiación puede clasificarse como electromagnética o de partículas, la electromagnética incluye luz visible, infrarroja y ultravioleta, rayos X y rayos γ ; mientras que la de partículas incluye electrones, positrones, protones y neutrones. La radiación también se clasifica en radiación ionizante y no ionizante. Este trabajo se enfoca en radiación ionizante, la cual es independiente de la naturaleza corpuscular u ondulatoria, y se define como aquella que tiene energía suficiente para romper enlaces moleculares. La ruptura de enlace puede ocurrir en materiales tales como el agua o incluso el ADN, los elementos constructivos de la vida humana [22].

La energía mínima requerida para ionizar un átomo, es decir, para remover un electrón del átomo, se conoce como potencial de ionización. Para los elementos químicos, la magnitud del potencial de ionización varía desde unos pocos electronvoltios para metales alcalinos hasta 24.5 eV para helio [23]. La radiación electromagnética de frecuencia superior a la región ultravioleta cercano del espectro electromagnético es ionizante, mientras que la radiación electromagnética con energía por debajo de la región ultravioleta lejana (por ejemplo, luz visible, infrarrojos y radiofrecuencia) no es ionizante. Dado que la energía necesaria para hacer que un electrón de valencia escape de un átomo es del orden de aproximadamente 4 eV - 25 eV, la radiación debe transportar energías cinéticas o cuánticas en exceso de esta magnitud para ser llamada “ionizante”. Este criterio incluye radiación electromagnética con longitudes de onda de hasta aproximadamente 320 nm, que contiene la mayor parte de la banda de radiación ultravioleta (UV) (~ 10 nm - 400 nm). Sin embargo, para efectos prácticos, estas radiaciones ultravioleta marginalmente ionizantes no suelen considerarse en el contexto de la física de las radiaciones y la dosimetría, ya que son incluso menos capaces de penetrar a través de la materia que la luz visible, mientras que otras radiaciones ionizantes son generalmente más penetrantes [24].

La radiación ionizante puede ionizar la materia, ya sea directa o indirectamente. La radiación directamente ionizante se refiere a partículas rápidas cargadas que depositan su energía en la materia directamente, a través de muchas interacciones pequeñas Coulombianas (electrostáticas) con electrones orbitales a lo largo de la trayectoria de las partículas. La radiación indirectamente ionizante se refiere a neutrones o fotones de rayos X o γ que primero transfieren su energía a partículas cargadas rápidamente liberadas en una o pocas interacciones en la

materia por la que pasan (figura 2-1). Las partículas rápidas cargadas resultantes depositan su energía directamente en la materia [1].

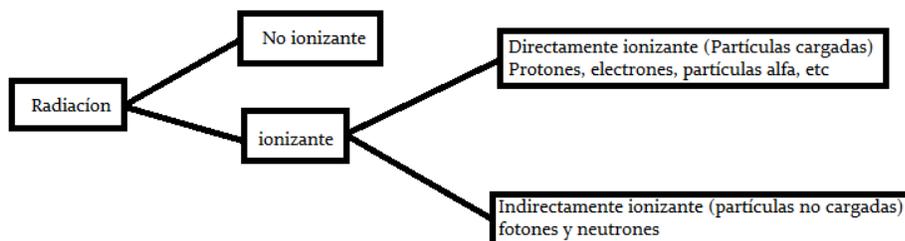


Figura 2-1.: Clasificación radiación ionizante. Imagen modificada de [1].

Se describen los tipos de radiación indirecta considerados en este trabajo:

- Rayos gamma (γ): Los rayos gamma son una forma de radiación electromagnética de alta energía y frecuencia, que se ubican en el extremo de la región del espectro electromagnético con longitudes de onda muy cortas, inferiores a 10 picómetros, lo que equivale a energías superiores a los 100 keV. Se trata de la forma de radiación electromagnética con la energía más alta y la longitud de onda más corta.

Los rayos gamma se producen por procesos nucleares, como la desintegración radiactiva, la fisión y la fusión nuclear, y también pueden ser emitidos por partículas cargadas de alta energía que interactúan con la materia. Debido a su alta energía y capacidad para penetrar la materia, los rayos gamma tienen diversas aplicaciones en la medicina, la industria y la investigación científica, pero también pueden ser peligrosos para la salud si se manejan incorrectamente [25].

- Rayos X: Los rayos X son una forma de radiación electromagnética con una longitud de onda en el rango de 0.01 a 10 nanómetros y energías que oscilan entre 120 eV a 120 keV. Debido a su capacidad para penetrar en materiales opacos, los rayos X tienen una amplia variedad de aplicaciones en la medicina, como en la radiografía de diagnóstico, tomografía computarizada y terapia de radiación en el tratamiento del cáncer. En la radiografía, se utilizan para generar imágenes de estructuras internas del cuerpo, lo que permite a los profesionales de la salud diagnosticar lesiones y enfermedades, mientras que en la tomografía computarizada se utilizan múltiples imágenes de rayos X para construir una imagen tridimensional de una región del cuerpo. En la terapia de radiación, los rayos X se utilizan para destruir células cancerosas. [26].

El rango de energías más utilizado en aplicaciones de radiación ionizante se extiende desde 10 keV a 25 MeV para electrones y fotones, neutrones hasta 100 MeV, protones hasta 300 MeV y partículas con carga más pesada hasta 400 MeV/ m_u , donde m_u es la unidad de masa atómica (también denotada por 'u') [24].

2.2. Equipo de carga diferida remota.

El equipo utilizado para realizar los procedimientos de braquiterapia en el Instituto Nacional de Cancerología es un GammaMed plus iX de la empresa Varian Medical Systems®[27]. Este es un dispositivo de carga diferida remota de alta tasa de dosis (HDR) Figura 2-2, el cual utiliza una fuente Gamma de Iridio-192 que posee un núcleo activo. El equipo cuenta con un Software de planificación para cálculo de dosis llamado BrachyVision®, que es el módulo de cálculo para braquiterapia de alta tasa de dosis del sistema Aria-Eclipse de Varian®.



Figura 2-2.: Equipo HDR GammaMed plus iX de carga diferida del Instituto Nacional de Cancerología.

2.3. Fuente de Ir-192

Uno de los principales radioisótopos que se utilizan en braquiterapia de alta tasa de dosis (BQT-HDR) es el Iridio 192, el cual tiene un tiempo de vida media de 73.83 días. Este radioisótopo decae principalmente por emisión β^- con una probabilidad de 95.24 % a Platino-192 y por captura electrónica (EC) con una probabilidad de 4.76 % a Osmio-192, luego estos decaen a sus estados fundamentales emitiendo rayos gamma. Los rayos gamma emitidos por el decaimiento del Ir-192 consisten en 41 energías discretas que van desde 8.91 KeV a 1378.2 KeV y la energía promedio de este espectro es de aproximadamente 397 KeV [1]. En la figura 2-3 se muestra un esquema reducido del decaimiento del Ir-192, donde se aprecia sus dos formas de decaimiento y la posterior emisión gamma.

La fuente radiactiva de Iridio-192 tiene diferentes encapsulados dependiendo el tipo de máquina de carga diferida que se use. En este caso se tiene un robot GammaMed plus iX de la

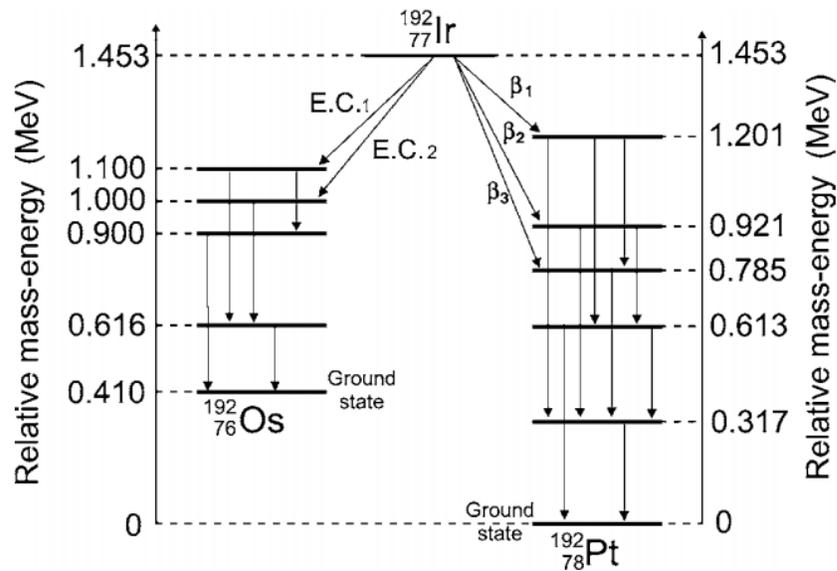


Figura 2-3.: Esquema de decaimiento reducido del Iridio-192 en Platino-192 a través de decaimiento β^- y en Osmio-192 a través de decaimiento por captura electrónica [1].

empresa Varian®), para la cual el diseño consiste en un núcleo activo de Iridio de 0.06 cm de diámetro y una longitud de 0.35 cm, dando como resultado del encapsulamiento un diámetro de 0.09 cm y una longitud de 4.52 mm como se aprecia en la figura 2-4 [2].

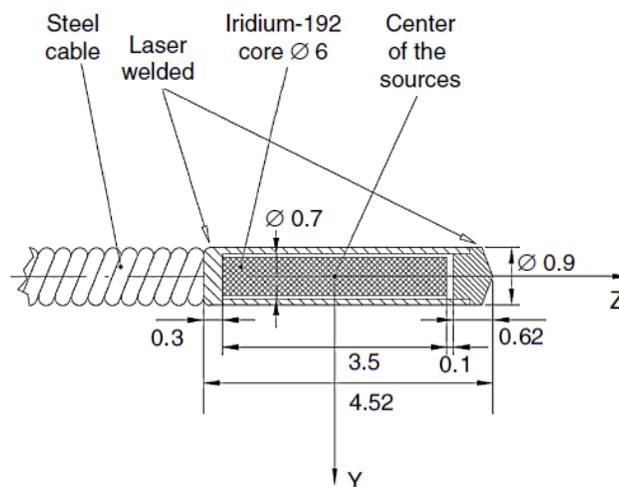


Figura 2-4.: Diseño y dimensiones de fuente Ir-192 para robot GammaMedplus iX [2].

2.4. Cámaras de Ionización

Las cámaras de ionización han sido históricamente el tipo de detector más utilizado para la dosimetría en radioterapia [28].

De forma esquemática, las cámaras de ionización constan de una zona sensible que es la cámara propiamente dicha y de un tallo. El volumen de aire sensible o cavidad está definido por tres electrodos, denominados:

Electrodo de polarización o electrodo externo, conectado directamente a uno de los polos de la tensión de polarización. Electrodo de colección, conectado a tierra a través de un circuito de baja impedancia (tierra virtual), y que recoge la carga o corriente creada en la cavidad de aire. Electrodo de guarda, conectado directamente a tierra y que tiene como finalidad definir el volumen sensible de la cámara e impedir que el electrodo colector recoja las corrientes de fuga que se pueden crear fuera de la cavidad de la cámara.

La cavidad está rellena de aire y la carga recogida se debe a la ionización de las moléculas de aire por los electrones de alta energía producidos por efecto fotoeléctrico, Compton o producción de pares, en la pared de la cámara o en el maniquí [3].

Las cámaras de ionización vienen de diferentes formas, tamaños y especificaciones dependiendo de las aplicaciones para las que sean requeridas. Las más comunes son las cámaras cilíndricas también llamadas tipo dedal **2-5**.

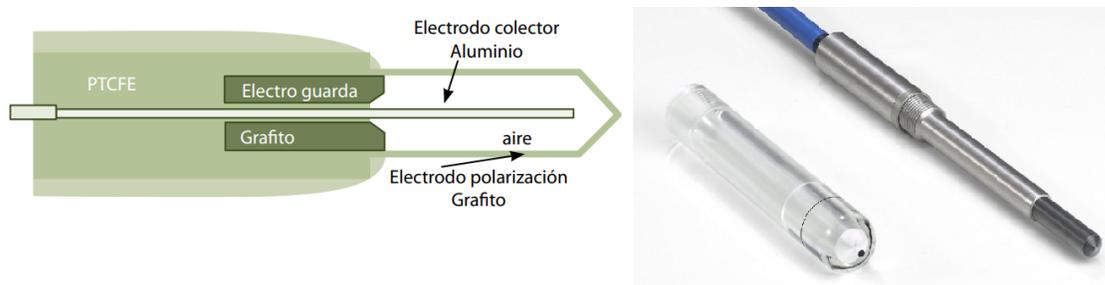


Figura 2-5.: Esquema y cámara de ionización cilíndrica tipo farmer [3].

En braquiterapia las cámaras utilizadas son de tipo pozo y se utilizan para realizar calibraciones y estandarizaciones de fuentes. Las cámaras de pozo tienen forma de cilindro vertical con un orificio interior donde se introduce el inserto en el que a su vez se sitúa la fuente. Los electrodos están situados en la pared exterior e interior del cilindro hueco que forma la cámara como se muestra en la figura **2-6** [4]. Estas cámaras son diseñadas para trabajar con fuentes de tamaños y formas típicas que son utilizados en la práctica clínica en braquiterapia [1].

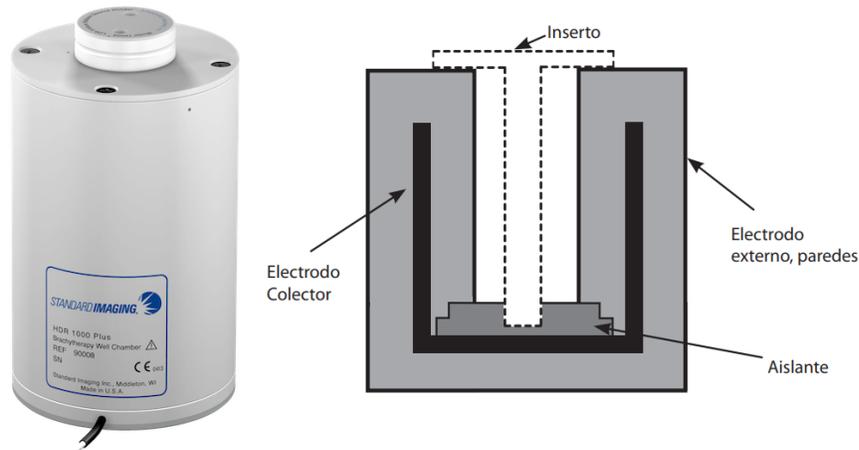


Figura 2-6.: Esquema y cámara de ionización tipo pozo [4].

2.5. Electrómetro

Las cargas o corrientes producidas en la cámara de ionización son muy pequeñas y se necesita un equipo muy sensible, un electrómetro, para poder detectarlas y medirlas. Un electrómetro está formado por un amplificador operacional de alta ganancia y una fuente de alimentación que proporcionara voltajes variables entre 0 y 400 V. El electrómetro usado en este caso fue UNIDOS E de la marca PTW® (Figura 2-7)



Figura 2-7.: Electrómetro UNIDOS E de la marca PTW®. Dispone de un selector de valores de tensión en pasos discretos y también de cambio de polaridad.

Si la calibración de la cámara de ionización no se realiza conjuntamente con el electrómetro que se usa, se habrá de añadir un factor más a las correcciones por magnitudes de influencia y este sería el factor k_{elec} , o factor de corrección por cambio de electrómetro, ya que las unidades en que se expresa un coeficiente de calibración de la cámara Gy/C o Gy/div, se refieren a culombios o divisiones de un electrómetro en concreto [3].

2.6. Películas Radiocrómicas

Las películas radiocrómicas (PR) son películas empleadas para dosimetría en radioterapia. Una de las ventajas que posee es que es tejido-equivalente. Estos films poseen una tintura especial que se polimeriza al ser irradiada y desarrolla diferentes tonalidades de azul, cuya intensidad de cambio de color depende proporcionalmente a la cantidad de radiación incidente. Este polímero absorbe luz, y luego su transmisión puede medirse con un densitómetro adecuado a fin de determinar la dosis a la que fue expuesto [1]. La estabilidad de su coloración debido a la incidencia de radiación sobre el mismo, ocurre pasadas alrededor de las 24 horas post-irradiación [29]. Se caracterizan también por tener una alta resolución y pueden ser utilizados en regiones que presenten alta dosis, por lo que pueden ser colocados cerca de fuentes de braquiterapia con fines dosimétricos. Los films radiocrómicos más comúnmente utilizados son los EBT2 y EBT3 de Grafchromic®), las cuales son sensibles a dosis entre 1 cGy a 50 Gy [30].

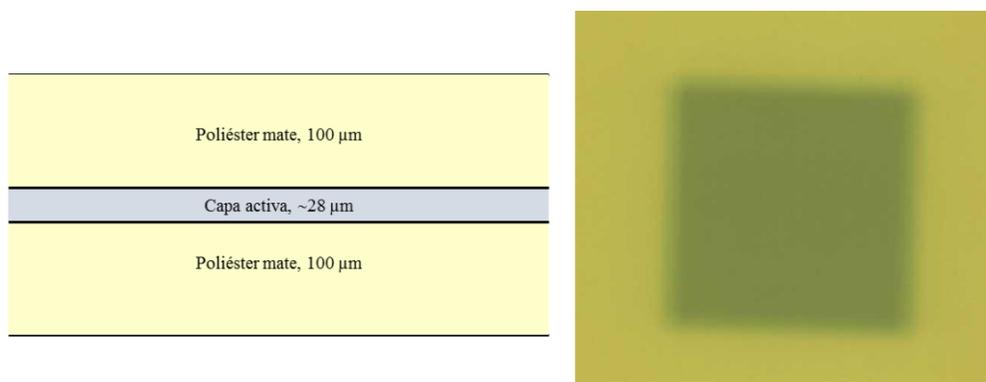


Figura 2-8.: Esquema de la estructura de la PR EBT3 [5].

La figura 2-8 muestra el esquema de la estructura de la PR EBT3, la cual tiene en una sola capa activa de 27 μm de espesor, entre dos sustratos de poliéster de 120 μm de espesor cada uno. La capa activa está compuesta de Hidrógeno (56.8%), Carbono (27.6%), Oxígeno (13.3%), Aluminio (1.6%) y Litio (0.6%), por lo tanto, posee un número atómico efectivo de 7.26 de acuerdo a lo reportado por el fabricante, mientras que el número atómico efectivo del agua es de 7.317, esta similitud entre los números atómicos efectivos hace que la película sea equivalente a tejido [5].

2.7. Línea celular

La línea celular que se utilizó para este estudio fue la línea celular SiHa, la cual se deriva de un carcinoma de células escamosas que se obtuvo por medio de cirugía de una paciente japonesa, infectada con el agente VPH-16 (virus de papiloma humano 16), con 1 a 2 copias

del genoma viral en el genoma celular. Las células SiHa son de tipo humano, con morfología epitelial y del tejido del cuello uterino. Estas células son utilizadas para cultivo celular, investigación sobre el cáncer, sobre enfermedades infecciosas y enfermedades de transmisión sexual [31].

2.8. Efecto de la radiación en la célula

La radiación ionizante (fotones) al interactuar con un medio material, llevan a cabo una serie de eventos y fenómenos dentro de este. Principalmente se producen los efectos de dispersión Compton, efecto fotoeléctrico y producción de pares al interactuar con los átomos y electrones del medio, además de producir ionizaciones y excitaciones [24]. Cuando el medio con el que interactúa la radiación es una célula, esas ionizaciones y excitaciones darán inicio a una serie de procesos o etapas que ocasionarán un efecto biológico determinado, que principalmente es el daño en las cadenas de ADN y la célula al estar compuesta en su mayoría por agua, más del 80 % de la masa celular [32], será ésta la principal molécula con la cual la radiación ionizante va a interactuar generando un fenómeno conocido como radiólisis del agua.

El efecto de la radiólisis del agua se lleva a cabo en tres diferentes etapas. La primera es la etapa física en la cual se dan los procesos de la ionización o excitación de los átomos o moléculas, esto mediante la transferencia de la energía cinética de la radiación incidente, lo que va a producir electrones libres, agua ionizada o excitada; todo este proceso se lleva a cabo en un tiempo aproximado de 10^{-16} s. Una vez completada la etapa física, se lleva a cabo la etapa físico-química en la cual se da la producción de radicales libres, en especial dos muy reactivos, el HO• (radical hidroxilo) y el H• (radical hidrógeno); esta etapa se lleva a cabo en unos 10^{-15} s – 10^{-12} s. La siguiente etapa se define como la etapa química, en esta se producen las interacciones químicas entre los radicales libres formados anteriormente y las demás moléculas del medio, produciendo un efecto en cascada, creando nuevas especies químicas y la formación de biomoléculas anormales, todo esto en un tiempo de 10^{-12} s – 10^{-6} s. La última etapa es la biológica, en la cual se evidencian los efectos de la radiación sobre la célula, estos efectos biológicos se logran generando daños en el ADN; sin embargo, estos efectos pueden tardar en aparecer desde los milisegundos hasta varios años (figura 2-9).

La radiólisis del agua se logra producir con al menos 13 eV y se genera un estado excitado de esta con 7.3 eV [32], dando lugar a esos radicales libres que son muy reactivos y que interactuarán con las biomoléculas causando rupturas en sus enlaces o la inactivación de sus funciones especiales. Es de resaltar que a medida que se aumenta la dosis suministrada en el medio se va a aumentar la cantidad de radicales libres en este [6].

El efecto anteriormente descrito se conoce como la acción indirecta de la radiación, pues el daño que se ocasiona en el ADN de la célula no lo ocasiona la radiación sino los radicales libres y demás moléculas que se forman y reaccionan en las etapas físico-química y química. Por otro lado, se tiene la acción directa de la radiación, que es el efecto directo sobre el núcleo de la célula y por ende sobre el ADN generando ionizaciones sobre el mismo (figura

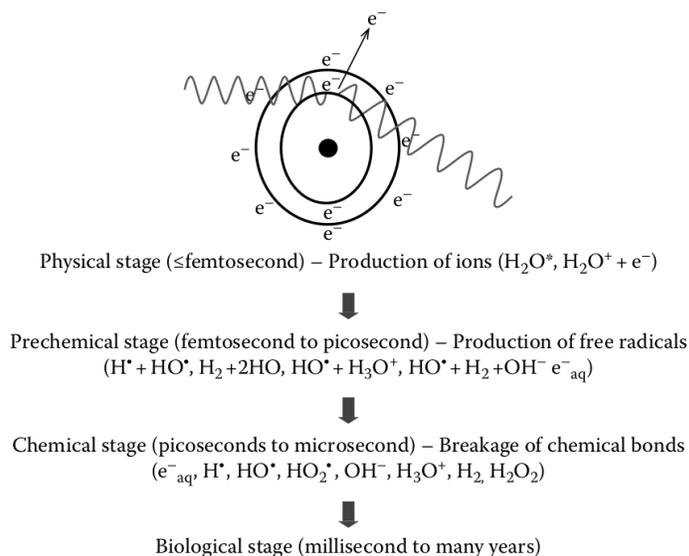


Figura 2-9.: Etapas de la interacción de la radiación ionizante con un medio acuoso (radiólisis del agua). Imagen tomada de [6].

2-10).

La acción directa o indirecta de la radiación ionizante sobre el ADN puede ocasionar diferentes tipos de daño, la mayor parte del daño producido sobre el ADN de la célula por la radiación se le atribuye a los radicales libres producidos durante la radiólisis del agua, aproximadamente un 60 % del daño [6]. De los diferentes tipos de daño que se pueden ocasionar se resaltan únicamente las rupturas simples de cadena de ADN (SSBs) y las rupturas dobles de cadena de ADN (DSBs) (figura 2-11).

Las SSBs se pueden dar por la rotura del enlace entre el fosfato y la desoxirribosa o también en el enlace entre las bases y la desoxirribosa y son generadas principalmente por la acción del radical hidroxilo ($\text{HO}\bullet$) que es altamente reactivo. Estas roturas por lo general son fácilmente reparadas por la célula. Las DSBs se dan por el rompimiento de dos hebras del ADN y son consideradas como la principal causa del daño en la célula, pues son difíciles de reparar, pueden causar mutaciones, aberraciones cromosómicas, afectar la estabilidad genómica y conducir a la muerte de la célula [6, 32].

Puede que otros agentes físicos o químicos lleguen a ocasionar este tipo de daño en el ADN, inducir mutaciones o incluso la muerte celular, sin embargo, la ventaja que posee la radiación ionizante frente a otros agentes es que logra depositar grandes cantidades de energía en espacios e intervalos temporales muy reducidos [32].

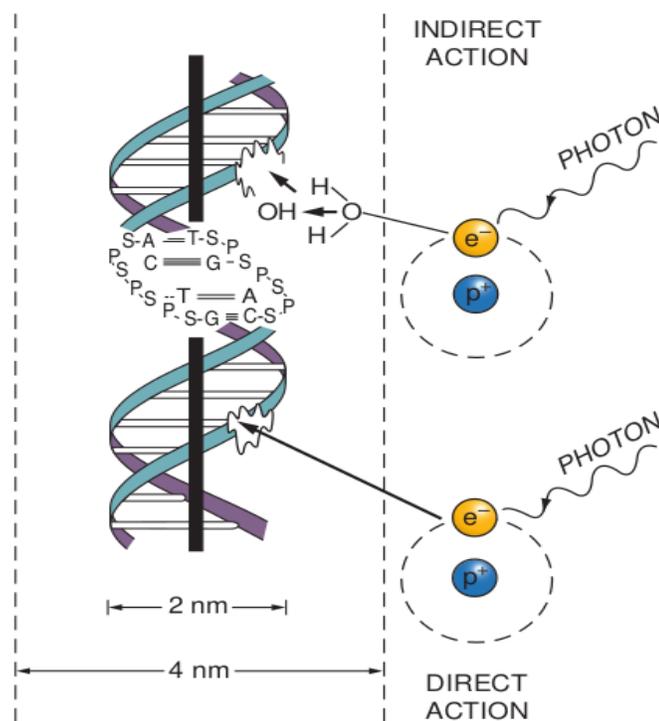


Figura 2-10.: Acción directa y acción indirecta de la radiación ionizante sobre la célula. Imagen tomada de [7].

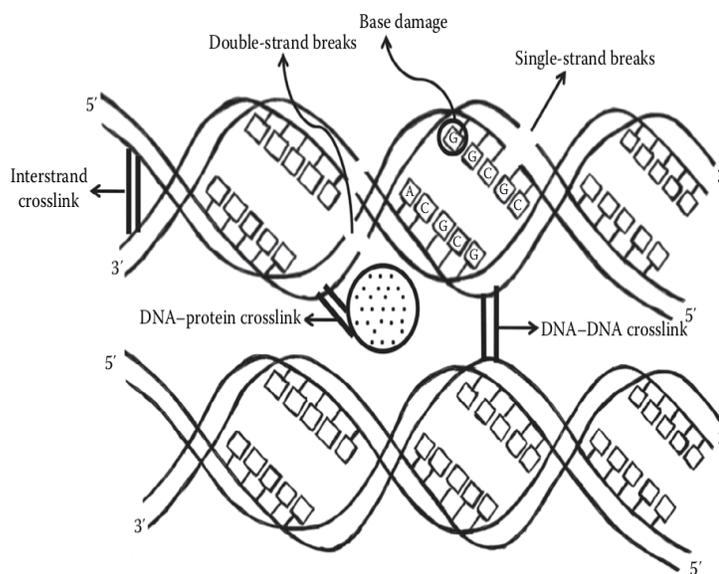


Figura 2-11.: Posibles daños en la cadena de ADN producto de la radiación ionizante. Imagen tomada de [6].

2.9. Modelo Lineal Cuadrático

Inicialmente el modelo lineal cuadrático fue formulado como un modelo empírico utilizado en el ajuste de aberraciones cromosómicas incorporando posteriormente las curvas de supervivencia celular. Este modelo establece que la muerte celular inducida por radiación tiene dos componentes: uno proporcional a la dosis, que es un componente lineal αd , y otro proporcional al cuadrado de la dosis, que es un componente cuadrático βd^2 .

Las constantes positivas α y β dependen del tejido. Siendo α la componente lineal relacionada a las lesiones letales, como las rupturas irreparables de la doble hebra del ADN que conducen a roturas cromosómicas. Esta componente está asociada a la radiosensibilidad del tejido. La componente cuadrática β está relacionada con los daños subletales o reparables, y está vinculada a la capacidad de reparación de los tejidos. Las dos componentes de muerte celular son iguales cuando $\alpha d = \beta d^2$ o $d = \alpha/\beta$. Esto significa que la componente lineal y cuadrática son iguales a una dosis que es igual a la relación de α a β , como se muestra en la figura 2-12. Una forma de definir la radiosensibilidad del tejido se representa mediante el cociente $d = \alpha/\beta$, este parámetro es el valor de dosis para la cual la probabilidad de suceso de un daño letal es igual a la probabilidad de ocurrencia de muerte celular por daño subletal. Cuánto más alto sea α/β mayor será la recta a la curva que representa poca capacidad de reparación celular, por otro lado, un α/β bajo significa que la curva se pronuncia muy fácilmente indicando una alta capacidad de reparación y de tolerancia a dosis bajas [6].

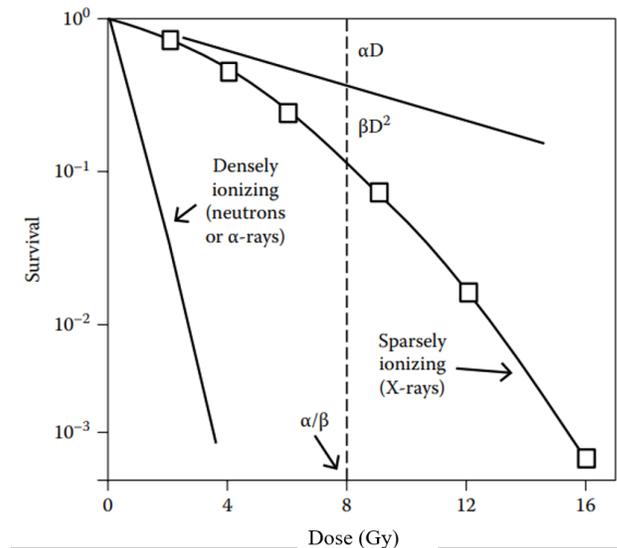


Figura 2-12.: Modelo lineal cuadrático basado en la curva de supervivencia celular. Imagen modificada de [6].

La figura 2-12 muestra también que para radiación con baja LET (Transferencia Lineal de Energía), y dosis bajas, la componente βd^2 es insignificante siendo la curva de supervivencia proporcional a la dosis, presentando por lo tanto un comportamiento lineal. En el caso de las

radiaciones de alta LET, el daño β es cero ya que su trayectoria de ionización induce roturas de doble cadena del ADN y, por lo tanto, la curva de supervivencia es lineal. Por otro lado, se puede observar que a dosis más altas, la supervivencia celular es proporcional al cuadrado de la dosis y la curva es cóncava hacia abajo.

Según este modelo lineal cuadrático, la fracción de supervivencia S a una dosis por fracción d en la radioterapia fraccionada convencional con rayos X está dada por:

$$S = e^{-(\alpha d + \beta d^2)}, \quad (2-1)$$

donde α y β son las pendientes o coeficientes iniciales y finales de los daños irreparables y reparables respectivamente.

En aplicaciones prácticas, el modelo lineal cuadrático se utiliza en radioterapia para planificar tratamientos de radiación y calcular dosis efectivas que minimicen el daño a los tejidos sanos circundantes. También se utiliza en estudios de investigación para determinar la sensibilidad de diferentes tipos de células a la radiación y para evaluar la eficacia de diferentes tratamientos radioterapéuticos [33].

El modelo lineal cuadrático se ha utilizado para investigar la respuesta de diferentes tipos de células cancerosas a la radiación y para desarrollar estrategias de tratamiento de radiación personalizadas para pacientes con cáncer. También se ha utilizado para evaluar la efectividad de diferentes agentes quimioterapéuticos en combinación con la radiación en el tratamiento del cáncer [34].

Por ejemplo, se realizó un estudio sobre la dosis de radiación necesaria para producir la muerte celular en líneas celulares de cáncer de pulmón, y aquí se utilizó el modelo lineal cuadrático para estimar la dosis necesaria para matar el 50 % de las células (LD50), para más detalle consultar [35].

2.10. Ensayos supervivencia celular

2.10.1. Ensayo por MTT

El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico para medir la actividad metabólica celular, el cual fue desarrollado por Mosmann en 1983 [36], siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color púrpura (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido [37], es decir, mientras más fuerte sea la tonalidad púrpura del pozo, más células vivas allí se encuentran como se muestra en la figura 2-13, donde los pozos cuya supervivencia celular es mayor están a la derecha y disminuyen hacia la izquierda.

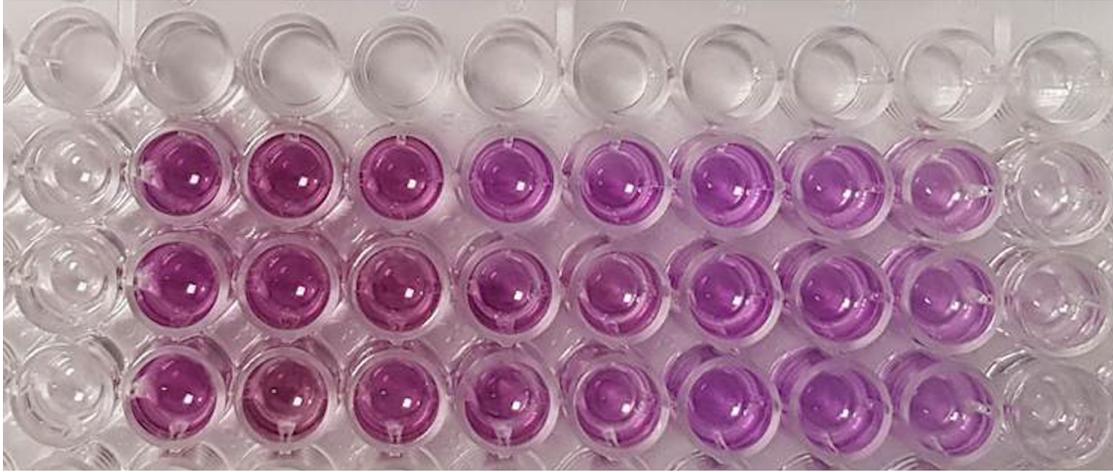


Figura 2-13.: Representación gráfica del ensayo por MTT. De derecha a izquierda se aprecia como la tonalidad púrpura disminuye, lo que indica una reducción de la supervivencia de las células [8].

2.10.2. Ensayo Clonogénico

Un ensayo de clonogenicidad es una técnica basada en cultivos celulares que permite evaluar la capacidad de células tumorales para proliferar y formar colonias tras ser tratadas con un agente citotóxico, como un fármaco o la radiación. Este tipo de ensayos se realizan a partir de un clon proveniente de una línea celular cultivada en laboratorio obtenida a partir de una biopsia tumoral. [38].

Es necesario establecer un límite de divisiones celulares para poder contar con un criterio que permita evaluar si una célula mantiene su capacidad de división tras recibir un tratamiento. Bajo este criterio, se dice que si una célula tras ser irradiada puede formar colonias de un mínimo de 50 células ($2^6 = 64$, siendo el exponente 6 el número de ciclos celulares que suele completar una célula irradiada antes de morir) habrá formado un clon que sigue presentando capacidad clonogénica pese al tratamiento [39].

Para el estudio de clonogeneidad se deben tener en cuenta dos parámetros que consideran diferencias en la capacidad de proliferar y de resistir al tratamiento entre distintos tipos de células cancerígenas. Estos parámetros son la eficiencia de sembrado (EF), que permite conocer la cantidad de colonias formadas en función de las células que fueron sembradas, y la fracción de supervivencia (S), que permite conocer el número de colonias desarrolladas tras aplicar el tratamiento en estudio [40].

$$EF = \frac{C_0}{N_0} \times 100, \quad (2-2)$$

siendo C_0 el número de colonias del control y N_0 el número de células sembradas en el control.

$$S = \frac{C_x}{N_x \times EF} \times 100, \quad (2-3)$$

donde C_x y N_x son la cantidad de colonias contadas y células sembradas para una dosis x y EF la eficiencia de sembrado.

3. Materiales y metodología

Este es un trabajo interdisciplinar y realizado en conjunto entre los grupos de investigación de Física Médica y Biología del Cáncer, el cual se llevó a cabo respectivamente en los departamentos de Radioterapia y Biología del Instituto Nacional de Cancerología E.S.E. A continuación, se presentarán los equipos y materiales usados para ejecutar este trabajo, así como la metodología que se implementó en el desarrollo del mismo.

3.1. Controles de Calidad

Antes de realizar cualquier tipo de experimentación es importante efectuar los controles de calidad de los equipos y materiales a utilizar, esto con el fin de tener un alto grado de seguridad en los procedimientos que se llevarán a cabo, y por ende en las medidas y resultados que se van a obtener. A continuación, se presentan los controles de calidad realizados a los equipos que intervienen en el proceso de irradiación y entrega de dosis de los experimentos.

3.1.1. Verificación de la actividad de la fuente

Para verificar la actividad de la fuente de radiación de Ir-192, que es enviada por el proveedor de servicios del Instituto Nacional de Cancerología, se procede a usar una cámara de Ionización tipo pozo de referencia STANDARD IMAGING HDR-1000 Plus cuyo voltaje promedio de funcionamiento ~ 300 V. Se conecta la cámara a un tubo de transferencia, y este al robot que contiene la fuente radiactiva (GammaMed Plus iX de 24 canales de Varian®), el cual se utiliza en los procedimientos de braquiterapia, como se muestra en la figura **3-1**.

Se programa el robot para ubicar la fuente en diferentes posiciones dentro de la cámara de ionización, con el fin de determinar el punto máximo de respuesta de la cámara, que es el mismo en el cual la cámara fue calibrada.

Para la caracterización de la actividad de las fuentes de braquiterapia se recomienda emplear la magnitud Intensidad de Kerma en Aire, definida como el producto de la Tasa de Kerma en Aire en el seno de aire y el cuadrado de la distancia entre el punto de calibración y el centro de la fuente en el eje bisector de la misma. Se simboliza como S_k , sus unidades son $S_k = [\text{Gy} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{h}^{-1} \text{ ó } \text{cGy} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}]$ [41], y se expresa como:

$$S_k = \bar{M}K_{PT}N_{SK} \quad (3-1)$$



Figura 3-1.: Montaje experimental para la verificación de la actividad de la fuente. En la imagen se muestra el robot GammaMed Plus iX, la cámara de pozo que esta conectada al robot mediante un tubo de tranferencia por donde va la fuente y esta a su vez conectada a un electrómetro para medir las cargas colectadas. Se sujeta el tubo de tranferencia a la camilla con el fin de que este llegue de manera perpendicular a la cámara y evitar posibles obstrucciones de la fuente.

Donde \bar{M} el e valor de carga [nC] colectada en 5 segundos, es decir corriente en nA y en la posición de la fuente donde la cámara tiene su máxima respuesta, N_{SK} es el coeficiente de calibración de Kerma en aire propio de la cámara de ionización en unidades de [Gy·m²/h·A] y K_{PT} es el factor de corrección por presión y temperatura que se expresa como:

$$K_{PT} = \frac{T}{T_0} \frac{P_0}{P} \quad (3-2)$$

Siendo T_0 y P_0 la temperatura y presión al momento de calibración de la cámara, y T y P la presión a temperatura ambientales al momento de realizar las medidas.

Posterior a esto, y para pasar el valor obtenido a unidades de actividad, se divide el resultado de S_k entre el factor de Conversión de Kerma en Aire a Actividad (F_{K-A}) para este tipo de fuente (Ir-192) [42], la cual relaciona la actividad de una fuente de radiación isotrópica puntual con la tasa de exposición en el aire a una distancia determinada.

$$A_E = \frac{S_k}{F_{K-A}}, \quad (3-3)$$

siendo $F_{K-A} = 4.0340E^{-3}$ [Gy·m²/h· Ci]

Finalmente, se determina el error porcentual del valor obtenido experimentalmente A_E , respecto al valor teórico A_T dado en el certificado de la fuente, teniendo en cuenta la ecuación de decaimiento exponencial por los días transcurridos desde que se emitió el certificado, esto es:

$$A_T = A_0 e^{\frac{\ln 2}{T_{\frac{1}{2}}} t} \quad (3-4)$$

Donde $T_{\frac{1}{2}} = 73.827$ [días] es el periodo de semidesintegración de la fuente de Ir-192, $t=25$ [días] es el tiempo transcurrido, $A_0 = 10$ [Ci] es la actividad inicial expedida en el certificado, y $A_T = 7.908$ [Ci] es la actividad al transcurrir ese número de días.

3.1.2. Tiempo de tránsito.

Para esta prueba se empleó una cámara de ionización tipo dedal de referencia FARMER PTW 0.6 cm³ TN 30010, y se programó el robot para que la fuente estuviera en una posición única, asociada al punto efectivo de la cámara como se muestra en la figura 3-2.



Figura 3-2.: Montaje experimental para la verificación del tiempo de tránsito. Se muestra el tandem que a su vez esta conectado al tubo de tranferencia y este al robot.

En la primera parte, relacionada con los tiempos estacionarios, en la posición mencionada anteriormente, se tomaron medidas con el electrómetro integrando en tiempos específicos (de 10 en 10 hasta 100 segundos), y obteniendo valores de carga en nC y de corriente en nA al dividirlo en los respectivos tiempos. En la segunda parte, relacionada a los tiempos de tránsito, se programó el robot para irradiar en los mismos tiempos determinados en la primera parte, pero en este caso se midieron los valores de carga, con el electrómetro, desde que la fuente salía del robot, hasta que ingresara de nuevo. Posteriormente, se dividieron los

valores de carga de la primera parte (tiempos estacionarios) entre los de la segunda parte (tiempos de tránsito), con el fin de determinar el tiempo efectivo. Se graficaron los valores de tiempo efectivo versus los tiempos estacionarios y se realizó una regresión lineal, donde el intercepto con el eje Y da una medida del efecto de tránsito de la fuente, y la pendiente representa la exactitud del temporizador del equipo.

3.1.3. Verificación de la dosis entregada.

Para los tratamientos de braquiterapia en el Instituto Nacional de Cancerología se cuenta con el sistema de planeación BrachyVison [®] de Varian, el cual es un Software que permite calcular la dosis a entregar en un tratamiento según las posiciones, los tiempos y la actividad de la fuente de radiación. Para corroborar que la dosis que se planea o calcula es la misma que se entrega, se planteó la irradiación de películas radiocrómicas, las cuales son detectores de dosimetría que tiene la capacidad de producir un cambio de color visible y permanente tras la irradiación.

El primer paso para este procedimiento es realizar la calibración del lote de películas radiocrómicas a usar. Para ello se irradiaron y escanearon un grupo de películas con diferentes dosis con el fin de relacionar la densidad óptica de cada película con la dosis. En la figura **3-3** a la izquierda se muestra el sistema y la configuración que se utilizó para la irradiación. A la derecha se ve la planeación de la dosis en el software BrachyVison [®] donde se aprecia que el 100 % de la dosis cubre la región de interés a irradiar en este caso un cuadrado de 2x2 cm. El sistema que se muestra en la imagen es un Bolus de parafina, el cual es un material que tiene propiedades radiológicas similares al tejido cuando se irradia, con poder de frenado y dispersor equivalente [43]. El sistema tiene 9 agujas por donde pasa la fuente radiactiva, y se utilizó no solo para la irradiación de las películas, sino para la posterior irradiación de los cultivos celulares.

Después de la calibración se plantearon 3 sistemas de irradiación (figura **3-4**), para corroborar que la dosis entregada respecto a la dosis planeada en el software BrachyVison [®] fuera la misma. En el primero se puso el sistema de parafina con una película radiocrómica encima, en el segundo se puso el sistema con un matraz y la película radiocrómica dentro del matraz simulando el lugar donde estarían realmente las células, y en el tercero se puso el sistema, encima un matraz con la película y agua que simula el medio de cultivo en el cual se encuentran las células. Para estos tres sistemas se entregó una misma dosis.

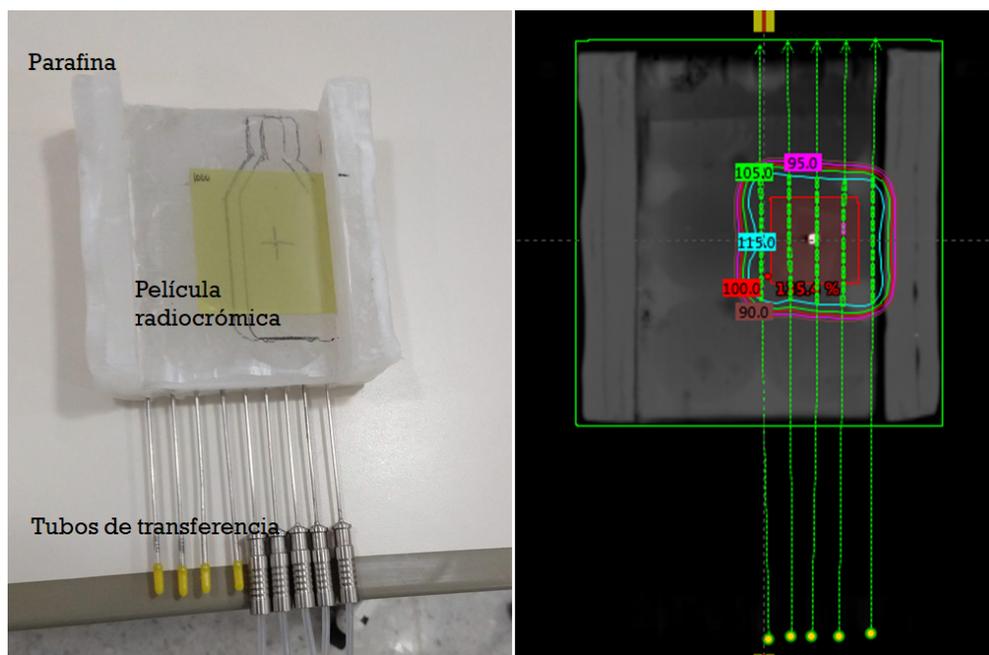


Figura 3-3.: Sistema construido y utilizado para la irradiación de películas radiocrómicas y de cultivos celulares. En la imagen se muestra el sistema de parafina y la película, junto con la tomografía hecha al sistema de irradiación y la planeación del cálculo de dosis que se hizo a partir de dicha tomografía.

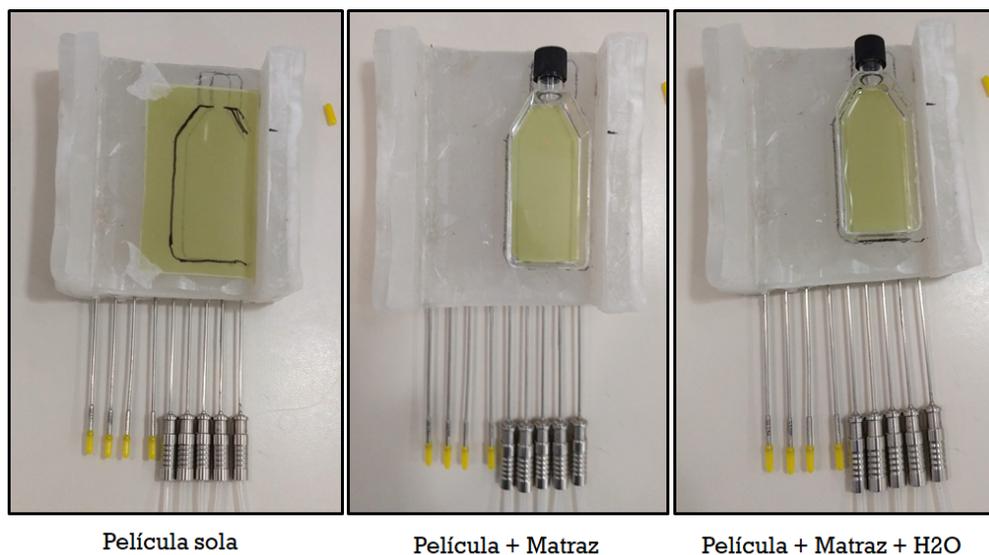


Figura 3-4.: Diferentes sistemas de configuración para irradiar y corroborar la dosis entregada. De izquierda a derecha, película radiocrómica únicamente, película dentro del matraz, y película dentro del matraz con agua.

3.2. Sembrado e irradiación de cultivos celulares

Después de realizar los controles de calidad y verificar la dosis a entregar, se procedió a irradiar los cultivos celulares bajo las siguientes condiciones. Se sembraron células del orden de 1×10^6 células por matraz, en matraces por separados para ser irradiados con diferentes dosis. Luego se tripsinizaron y sembraron las células en dos placas de 96 pozos, con el fin de determinar la supervivencia usando el método de MTT. Se sembraron 5000 células por pozo y la configuración de sembrado se muestra en la figura 3-5.

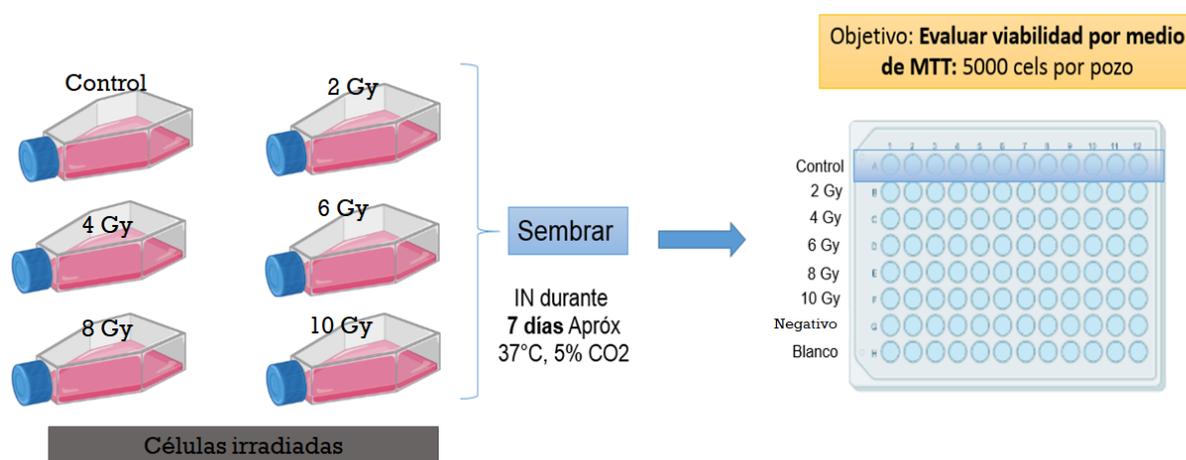


Figura 3-5.: Configuración de los cultivos celulares irradiados en los matraces y del posterior sembrado celular en la placa de 96 pozos.

En la imagen se pueden ver que se sembró un grupo de control positivo (células sin irradiar), otro de control negativo (células muertas), un blanco (que contiene solo medio) y las respectivas dosis, a lo largo de la placa de 96 pozos. En la figura 3-6 se muestra una foto del proceso de sembrado en el laboratorio de Biología del Cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología. Este proceso de sembrado se llevó a cabo teniendo en cuenta la metodología desarrollada por Rafael Chona en su trabajo de investigación, para más detalle consultar [44].

Para la irradiación se simuló (toma de tomografía) el sistema junto con un matraz con agua la cual representa el medio de cultivo celular, para posteriormente delimitar y hacer el cálculo de la dosis a entregar, como se ve en la figura 3-7

En la figura se puede ver delimitada una región en violeta denominada CTV la cual se refiere a la región donde está el medio celular y las células, y se delimitó a su alrededor una región de color rojo llamada PTV, con un margen de 1 mm en todas las direcciones, para tener en cuenta las incertidumbres que se pueden presentar al momento de ubicar y replicar el procedimiento de irradiación. Las curvas en color representan las líneas de isodosis.

Para la dosis fraccionada se sembraron dos matraces con células del orden de 1×10^6 células por matraz, para ser irradiadas con dos dosis diferentes respectivamente, siguiendo los dos

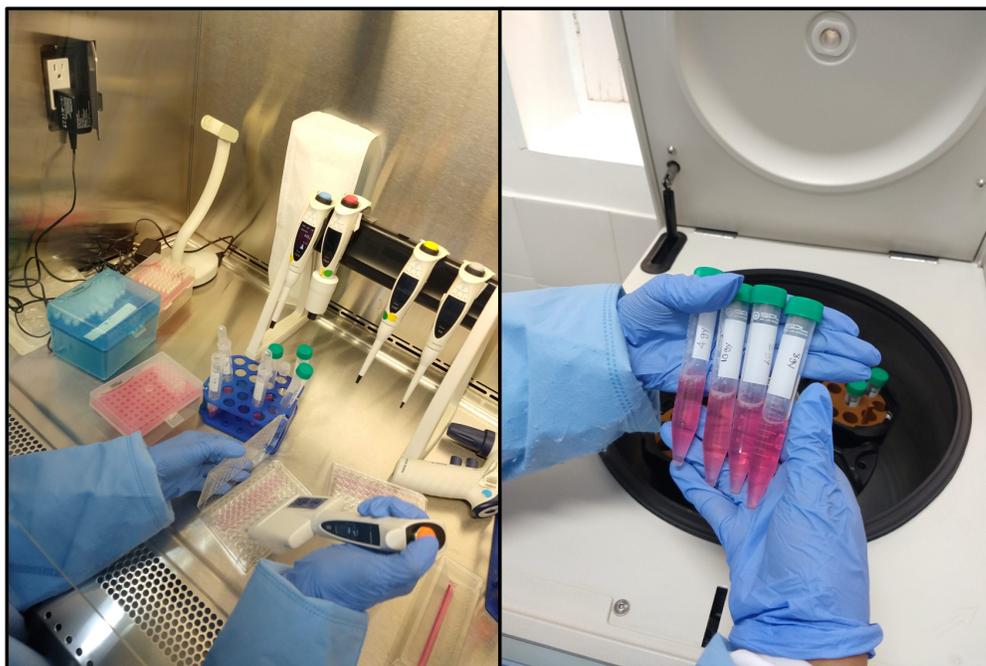


Figura 3-6.: Fotos tomadas sembrando los cultivos celulares en el laboratorio de Biología del Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología.

esquemas de irradiación más comunes en los tratamientos de braquiterapia en el Instituto Nacional de Cancerología (INC). El Esquema 1 con dosis de 5.5 Gy en 5 fracciones y el Esquema 2 con dosis de 7 Gy en 4 fracciones. Estas irradiaciones se realizaron día de por medio ya que de esta misma manera se realizan los tratamientos de braquiterapia en el INC. En la figura 3-8 se representa el sembrado de este experimento dejando una fila para el control, una para el negativo una para el fondo o blanco y las demás para cada una de las dosis irradiadas. Al igual que en el ensayo de la curva de supervivencia, se determina la supervivencia celular a través del ensayo por MTT.

3.3. Supervivencia celular

Para evaluar la supervivencia celular después de irradiadas las células, se realizó un ensayo por MTT, el cual es un ensayo colorimétrico para medir la actividad metabólica de las células [8]. Cuando se agrega el MTT se absorbe por las células, generando un color púrpura característico y con esto, los pozos de células que tengan una mayor tonalidad de este color indica que hay más células vivas. Para determinar la cantidad de células vivas en un pozo se utiliza un equipo lector de microplacas Multiskan de la marca THERMO SCIENTIFIC, el cual determina la densidad óptica de cada pozo de la placa de 96 pozos, en una longitud de onda de entre 560 nm y 650 nm.

La lectura y análisis con MTT se realizó al día 1, 4 y 7 después de sembradas las célu-

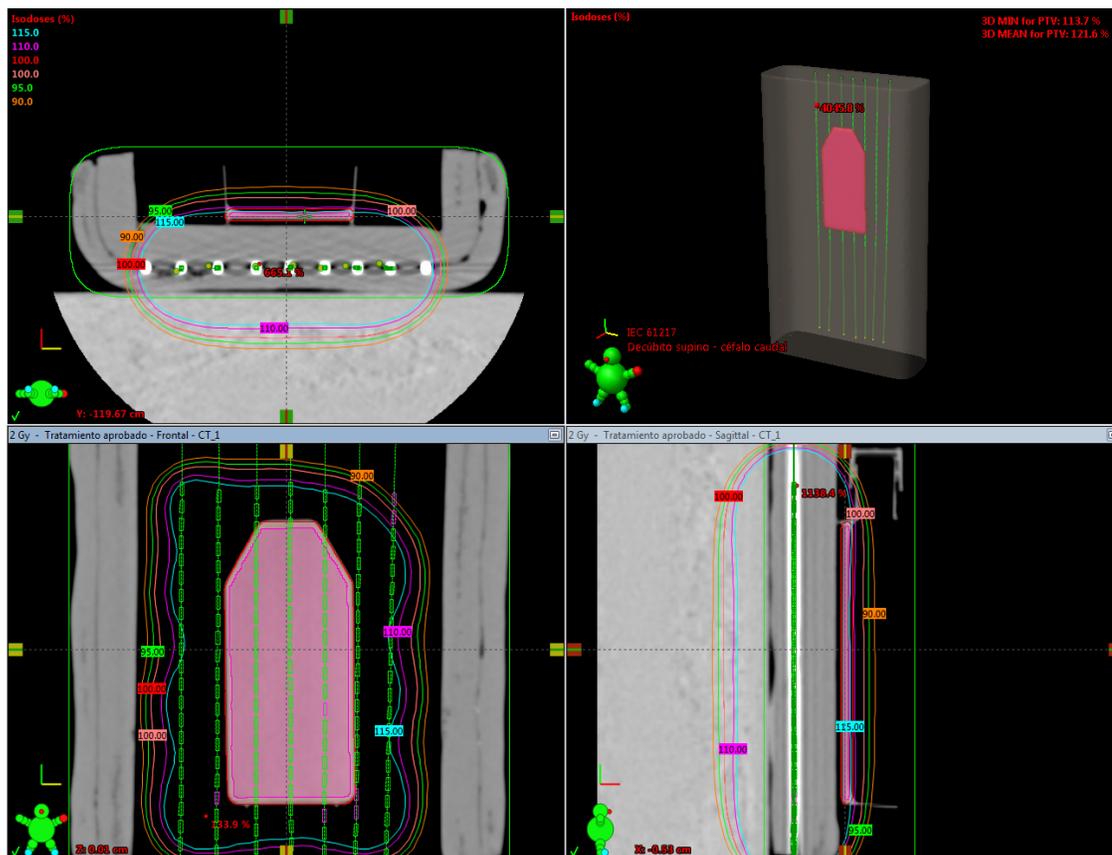


Figura 3-7.: Captura de imagen de la planeación de la dosis de tratamiento que se entregará al cultivo celular, realizada en el software Eclipse de Varian ®.

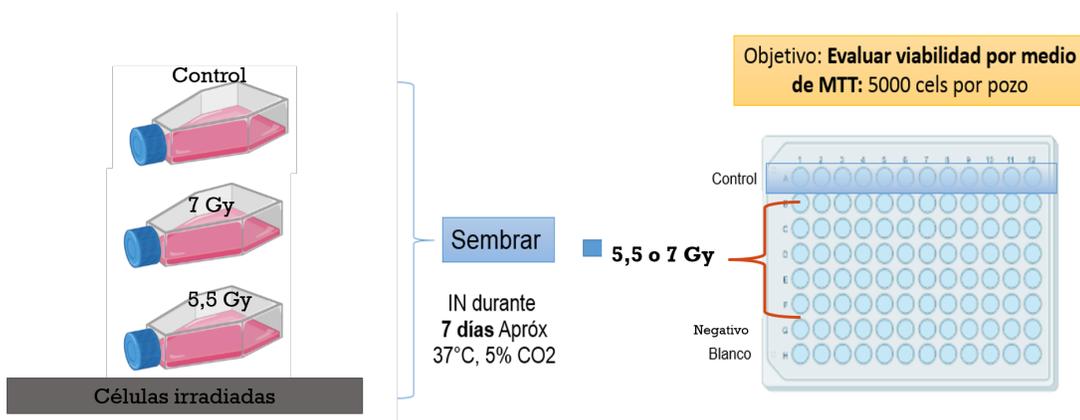


Figura 3-8.: Configuración de los cultivos celulares irradiados en los matraces y del posterior sembrado celular en la placa de 96 pozos.

las, tomando en cada día cuatro pozos por cada sembrado, leyendo cada pozo tres veces y realizándolo por duplicado es decir en dos placas de 96 pozos diferentes, esto con el fin de aumentar la estadística de los datos obtenidos y disminuir los errores lo más posible. La im-

plementación de este ensayo se llevó a cabo teniendo en cuenta el protocolo ya estandarizado para esta misma línea celular por Rafael Chona en su trabajo de investigación, para más detalle consultar [44].

También se llevaron a cabo en simultáneo ensayos clonogénicos para determinar la supervivencia celular y la capacidad de proliferación celular, sin embargo los resultados no fueron concluyentes, ya que no se observa una tendencia decreciente de la supervivencia celular a medida que se aumenta la dosis, además de una proliferación celular nula para las dosis altas, por lo que se descartó este método. Los resultados e imágenes tomadas se muestran en el anexo D.

4. Resultados y análisis de datos

A continuación se presentan los resultados obtenidos teniendo en cuenta la metodología descrita anteriormente.

4.1. Controles de calidad de la fuente y verificación de la dosis a entregar

Como se mencionó en la metodología, antes de realizar cualquier tipo de irradiación a los cultivos celulares, es necesario que se realicen los controles de calidad asociados a los equipos utilizados en el área de radioterapia.

En primera instancia se realizaron los controles de calidad asociados a verificación de la actividad de la fuente y los tiempos de tránsito al momento de realizar alguna irradiación. Estos controles de calidad se hicieron siguiendo los protocolos ya establecidos en el Instituto Nacional de Cancerología, adicionándole el cálculo de la incertidumbre de las medidas.

El cálculo de las incertidumbres para estos valores, como para los demás obtenidos en este trabajo de investigación, se realizaron a partir de dos ecuaciones. La primera ecuación usada para la incertidumbre debido a medidas directas

$$\delta\bar{x} = \frac{s}{\sqrt{N}}, \quad (4-1)$$

siendo s es la desviación estandar y N el número de datos. La segunda ecuación utilizada para la incertidumbre debido a medida indirectas

$$\delta f(x, y, \dots, n) = \left| \frac{\partial f}{\partial x} \right| \delta x + \left| \frac{\partial f}{\partial y} \right| \delta y + \dots + \left| \frac{\partial f}{\partial n} \right| \delta n, \quad (4-2)$$

donde $\left| \frac{\partial f}{\partial n} \right|$ es la derivada parcial de f respecto a una cantidad n y δn es la incertidumbre asociada a la medición de n .

Para determinar la actividad de la fuente se realizó el montaje mostrado en la figura 3-1 y teniendo en cuenta la ecuación 3-1, se programó el robot para que ubicara la fuente en diferentes posiciones con el fin de encontrar el punto de mayor respuesta de la cámara de ionización. Se tomaron tres medidas de carga en nC en un tiempo de 5 segundos cada medida, y a partir de esto poder determinar el valor de la corriente $\bar{M} = 51.92 \pm 0.02[\text{nA}]$. Los resultados de estas medidas se muestran en la tabla A-1 del anexo A. Para realizar la

corrección por presión y temperatura se usó la ecuación 3-2 siendo $T_0 = 22[^\circ]$ y $P_0 = 101.33$ [kPa] y $T = 19.2[^\circ]$ y $P = 75.1$ [kPa], dando como resultado un valor para $K_{PT} = 1.336 \pm 0.008$. Con estos valores determinados, y el coeficiente $N_{SK} = 4.639E05 \pm 0.028[\text{Gy}\cdot\text{m}^2/\text{h}\cdot\text{A}]$ el cual es propio de la cámara de ionización, se obtuvo el valor de $S_k = 0.032 \pm 0.056$ [$\text{Gy}\cdot\text{m}^2\cdot\text{h}^{-1}$]. Se dividió el valor de S_k entre el factor de conversión Kerma en aire a actividad $F_{K-A} = 4.0340E-03[\text{Gy}\cdot\text{m}^2/\text{h}\cdot\text{Ci}]$ como se muestra en la ecuación 3-3 dando como resultado:

$$A_E = \frac{S_k}{F_{K-A}} = \frac{0.032 \pm 0.056[\text{Gy}\cdot\text{m}^2/\text{h}]}{4.0340E-3[\text{Gy}\cdot\text{m}^2/\text{h}\cdot\text{Ci}]} = 7.98 \pm 0.56[\text{Ci}] \quad (4-3)$$

Para determinar el error porcentual entre el valor experimental y el valor teórico, dado en el certificado de la fuente el cual es proporcionado por el proveedor, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\Delta A = \frac{|A_E - A_T|}{A_T} \times 100; \quad (4-4)$$

donde $A_E = 7.980[\text{Ci}]$ es el valor experimental de la actividad y $A_T = 7.908[\text{Ci}]$ es el valor teórico calculado a partir de la ecuación 3-4 de decaimiento exponencial de la fuente radiactiva, dando como resultado un error del $\Delta A = 0.9104\%$.

Respecto a la determinación del tiempo de tránsito de la fuente se realizaron mediciones de cargas en nC en diferentes rangos de tiempos, determinando así el tiempo estacionario y el tiempo efectivo, los datos obtenidos se muestran en las tablas **B-1** y **B-2** del anexo B. Al efectuar un cociente entre estos valores se pudo determinar el tiempo efectivo, el cual se graficó versus los rangos de tiempos establecidos como se muestra en la gráfica **4-1**

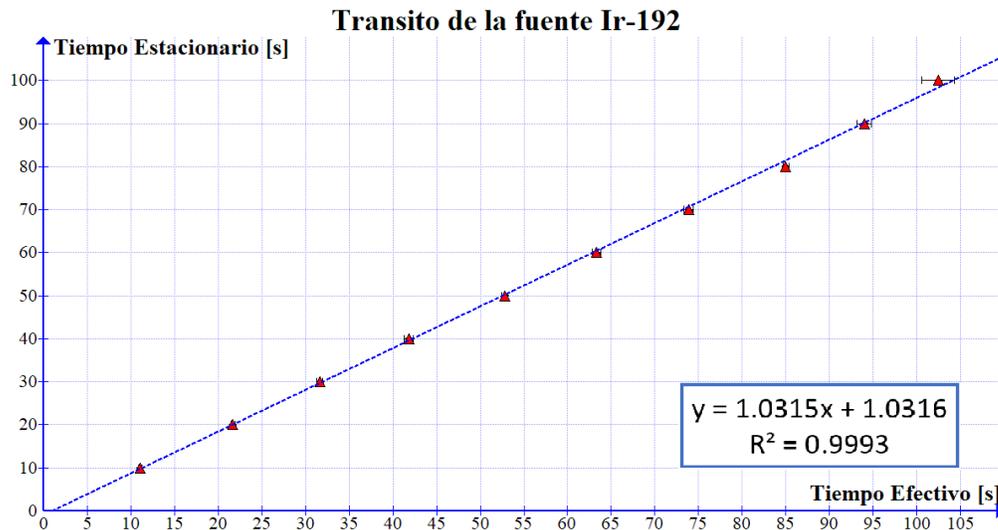


Figura 4-1.: Tiempo estacionario Vs tiempo efectivo. Regresión lineal para determinar el tiempo de transito de la fuente.

4.1 Controles de calidad de la fuente y verificación de la dosis a entrega²⁹

De la regresión lineal se puede apreciar que el intercepto con el eje Y da una medida del efecto de tránsito de la fuente siendo este de $\Delta T_{tr} = 1.031[s]$, y la pendiente representa la exactitud del temporizador del equipo siendo este del 103.15% es decir con un porcentaje de error del 3.15% .

La verificación de la dosis a entregar se llevó a cabo con ayuda de películas radiocrómicas, y para esto primero se realizó la calibración de lote de películas teniendo en cuenta el montaje experimental y la planeación de las dosis como se muestra en la figura 3-3. Se irradiaron las películas con dosis desde 100 [cGy] hasta 1000 [cGy] (100 cGy, 150 cGy, 180 cGy, 200 cGy, 250 cGy, 300 cGy, 400 cGy, 500 cGy, 600 cGy, 700 cGy, 800 cGy, 900 cGy, 1000 cGy,) y posteriormente escanearon, teniendo en cuenta una película para tomar el fondo (0 cGy), usando el software RIT 113 Versión 5.1 (Radiological Imaging Technology, Inc., Colorado Springs)[45]. Al escanear las películas el software permite relacionar la densidad óptica de cada película irradiada con respecto a un valor de dosis asignado, y con estos datos realizar una regresión para obtener una curva de calibración. Para este caso el software realizaba regresiones de varios tipos y el que se ajustó mejor a los datos fue la regresión polinomial por partes.

Realizada la curva de calibración se plantearon 3 sistemas de irradiación para verificar la dosis tal y como se presentó en la metodología y como se muestra en la figura 3-4, sistema de placa sola, placa dentro del matraz y placa dentro del matraz con agua, entregando en cada caso una dosis de 200 cGy. Los resultados para la irradiación del primer sistema (placa sola) se muestran en la figura 4-2 la cual es una captura de pantalla del Software RIT.

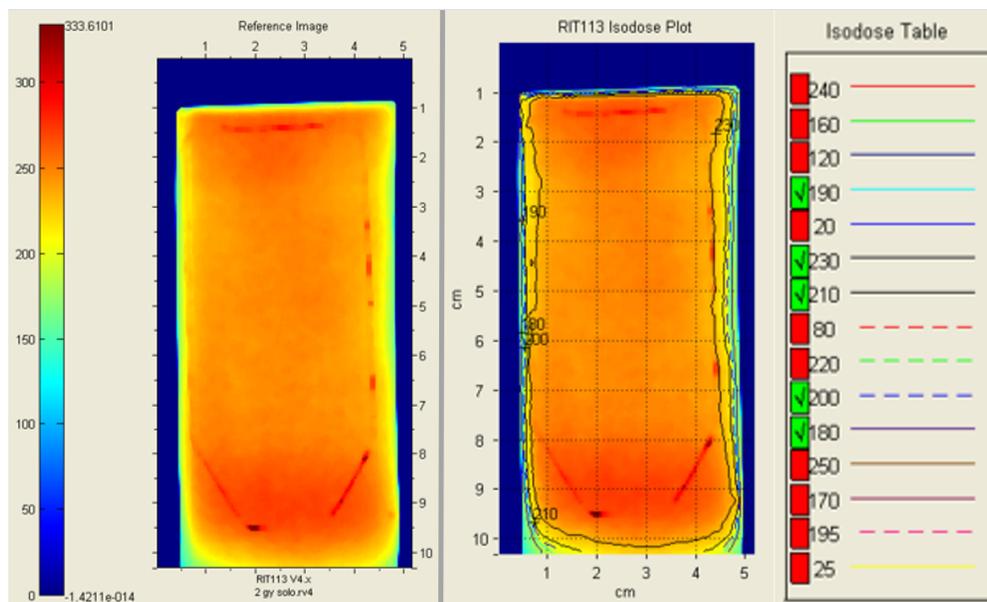


Figura 4-2.: Lectura de la película radiocrómica irradiada con la primera configuración (placa sola).

En la figura se muestra la película escaneada junto a una escala de colores que da una idea

del rango desde la dosis más baja hasta la más alta. A la derecha de la imagen se muestra la misma película escaneada pero con las curvas de isodosis, donde se aprecia que entre el 200 cGy y 190 cGy cubren casi la totalidad de la película esto es entre el 95 % y el 100 % de la dosis, lo cual es de esperarse ya que se irradió de forma similar a como se obtuvo la curva de calibración de las películas. En la figura 4-3 se observa el resultado de la irradiación para el segundo sistema donde se tiene la película dentro del matraz asemejándose mas al montaje que se tendrá al mometo de irradiar los cultivos.

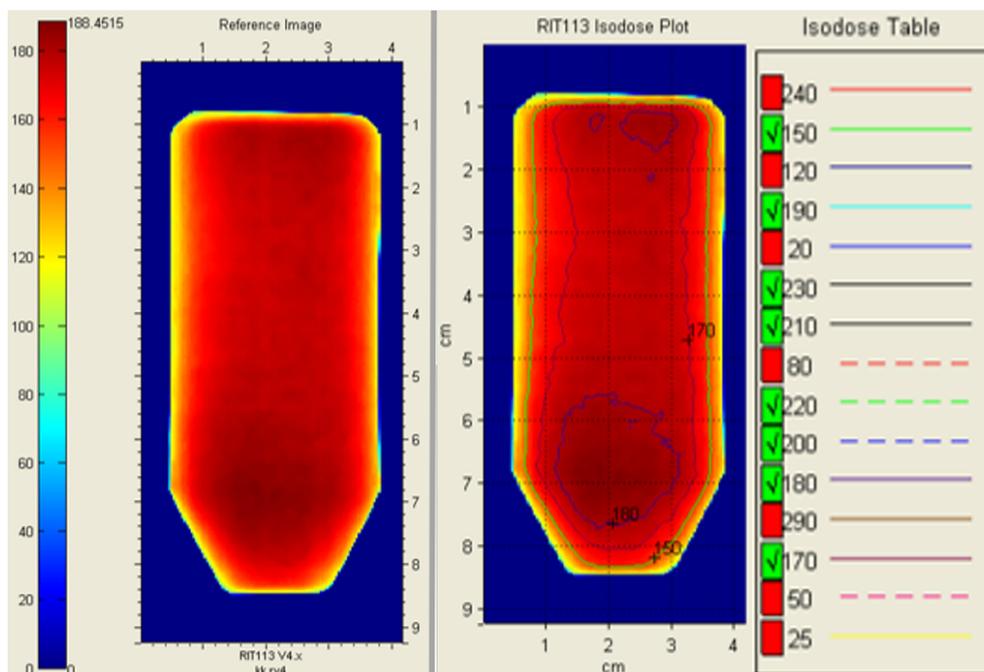


Figura 4-3.: Lectura de la película radiocrómica irradiada con la segunda configuración (placa dentro del matraz).

En la imagen se puede ver que la escala de colores ni siquiera llega a 200 cGy es decir al 100 % de la dosis, lo cual se corrobora en la imagen con las curvas de isodosis, ya que 200 cGy no aparece y tan solo 170 cGy es decir el 85 % de la dosis cubre la mayoría de la película. Algo similar ocurre para el sistema 3, el cual comprende la película dentro del matraz y llenado con agua simulando el medio de cultivo celular, como se muestra en la figura 4-4. Estos dos sistemas de irradiación presentan resultados similares.

Esto nos muestra que, en el caso más cercano a la realidad como se van a irradiar las células, se está presentando una subdosificación de aproximadamente el 15 %. Para solucionar este hecho se recalculó la dosis de planeación en el software BrachyVison [®], como se muestra en la figura 4-5, donde se modificaron las curvas de isodosis para que el 115 % de dicha dosis cubriera en su totalidad el CTV es decir la región donde estarían las células.

Reescalada la dosis, se procedió a irradiar nuevamente el sistema con la configuración 3, ya que es la que más se acerca al proceso real de irradiación de las células, obteniendo un

4.1 Controles de calidad de la fuente y verificación de la dosis a entrega β 1

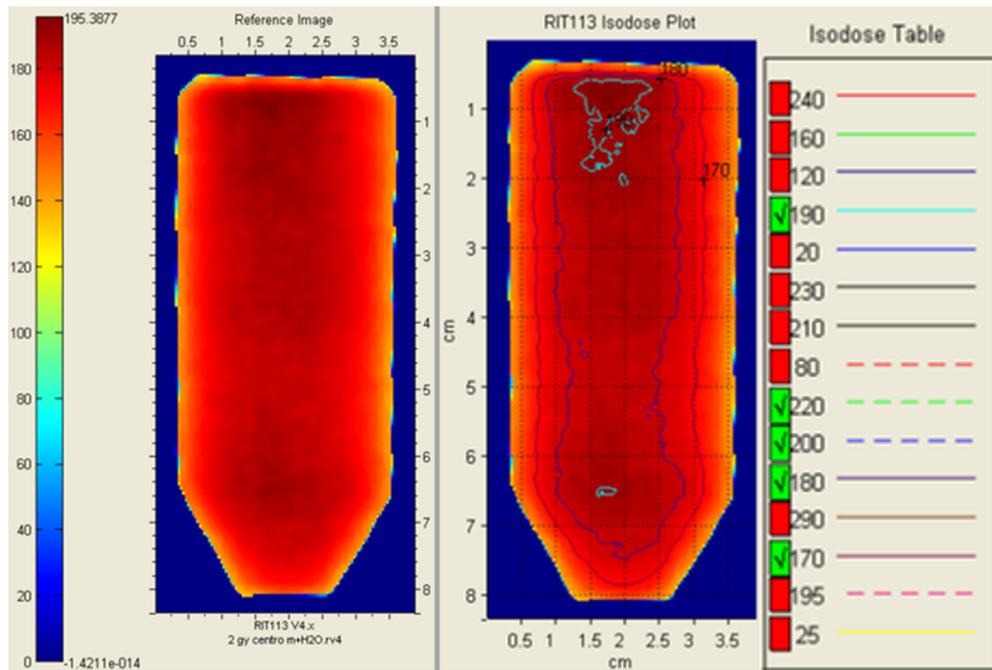


Figura 4-4.: Lectura de la película radiocrómica irradiada con la tercera configuración (placa dentro del matraz con agua).

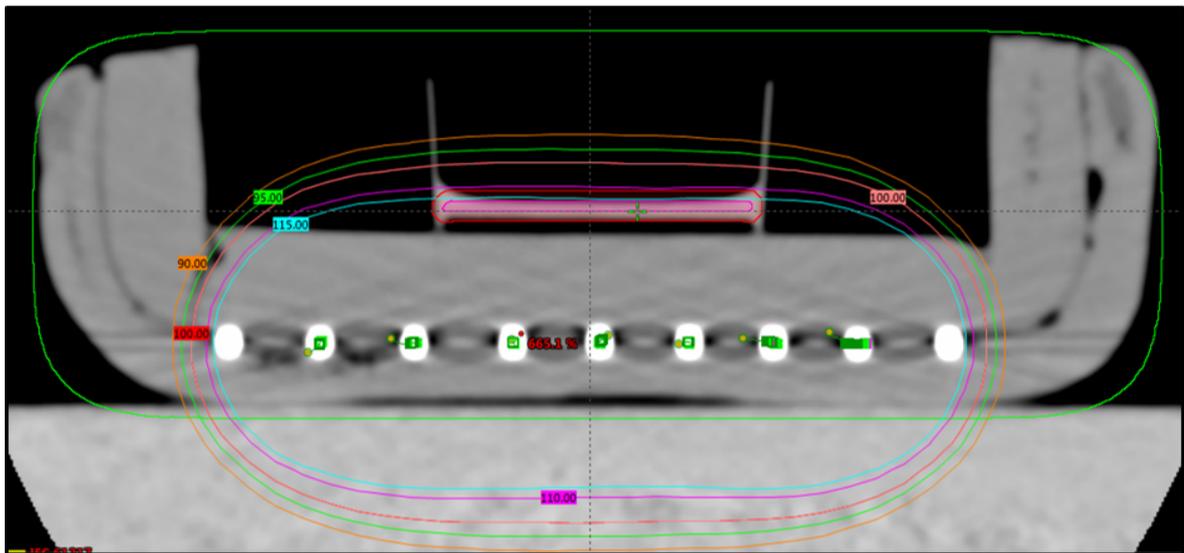


Figura 4-5.: Re-escalamiento de la dosis en el software BrachyVision $\text{\textcircled{R}}$ buscando que la isodosis de 115% cubra la region del CTV (en púrpura).

cubrimiento de la película de entre el 95% y el 100% de la dosis como se muestra en la figura 4-6. Cabe mencionar que este proceso también se realizó con una dosis de 1000 cGy para descartar que este fenómeno se estuviera presentando solo para dosis bajas.

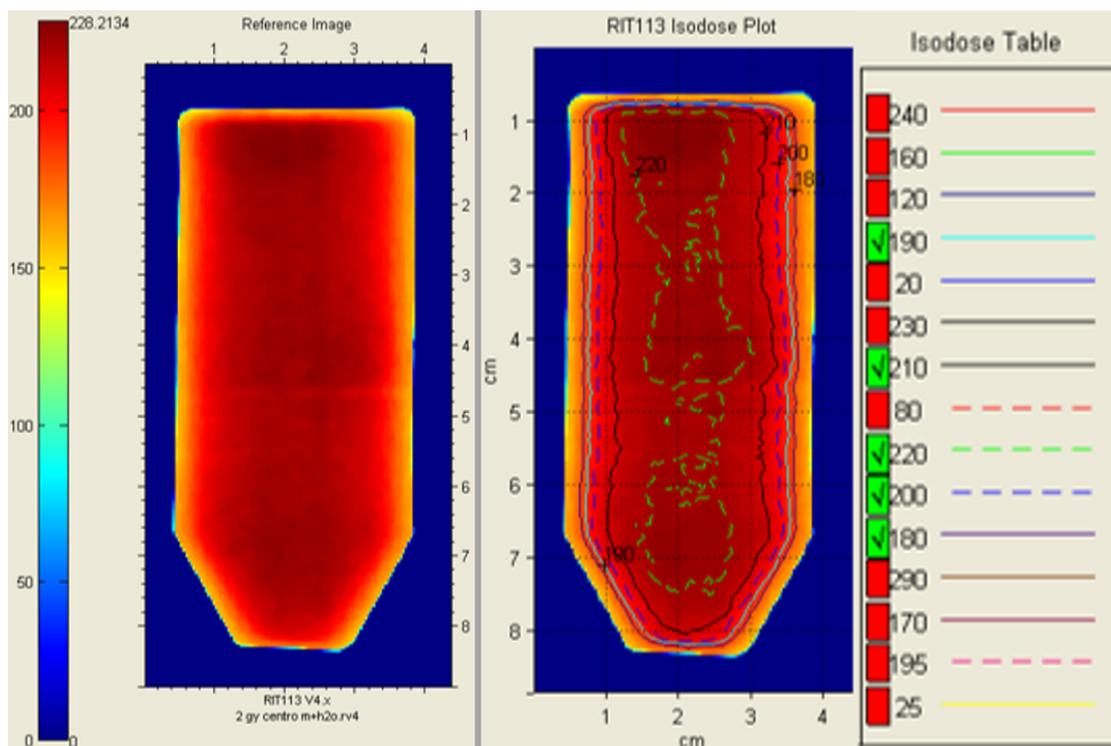


Figura 4-6.: Lectura de la película radiocrómica irradiada con la tercera configuración después de reescalar la dosis. Se aprecia que entre el 100 % y el 95 % de la dosis cubre toda la película.

4.2. Cultivos celulares, irradiación y curva de supervivencia celular

Como se mencionó en la metodología, los cultivos celulares de la línea celular SiHa, se sembraron en diferentes matraces como se muestra a la izquierda de la figura 3-5. Se sembraron 6 cajas para las dosis de 2, 4, 6, 8, 10 Grays respectivamente y para el control, para así poder determinar una curva de supervivencia celular. Las cajas se irradiaron teniendo en cuenta el cálculo de dosis realizado en el software BrachyVison [®] como se muestra en la figura 3-7. En la figura 4-7 se puede ver el sistema utilizado para la irradiación, el robot que contiene la fuente, el sistema de parafina con las agujas por donde va la fuente, los tubos de transferencia conectados al robot y el matraz el cual se ubica en la parte superior de la parafina. Cabe mencionar que se sitúa el matraz de esta manera, ya que las células se encuentran adheridas en el fondo del matraz y así es mas conveniente realizar la irradiación según lo encontrado en la literatura [46, 47].

Después de irradiadas las células se procedió a desprender las células de las cajas y sembrarlas en una placa de 96 pozos para su posterior análisis. Las células se sembraron por filas como se muestra en la figura 3-5, una fila para el control, otra para el control negativo (células



Figura 4-7.: Montaje experimental utilizado para la irradiación de los cultivos celulares. En la imagen se ve el robot Gamma Med Plus iX que contiene la fuente, los tubos de transferencia, las agujas por donde pasa la fuente y la parafina utilizada para sostener las agujas y el matraz

mueratas), otra para el fondo y las demás para cada una de las dosis irradiadas. Como se mencionó en la metodología, en la placa de 96 pozos se sembraron 5000 células por pozo para realizar el análisis de la supervivencia celular mediante el ensayo de MTT siguiendo la metodología desarrollada por [44].

El análisis de la supervivencia celular se realizó a las 24 horas, a los 4 días y al día 7 después de sembradas en la placa de 96 pozos, tomando de a 4 pozos por día, esto con el fin de ver el comportamiento de las células a medida que pasaba el tiempo y como la radiación las va afectando, además de poder descartar mediciones anómalas de algún pozo.

Para determinar la curva de supervivencia celular se realizaron tres ensayos de supervivencia, cada uno por duplicado, es decir sembrando dos placas de 96 pozos y realizando la lectura de cada pozo 3 veces, con el fin de tener la mayor cantidad de datos posibles y así disminuir el error. En cada análisis se normalizaron las medidas de las dosis respecto a las medidas del control restándole el fondo y el negativo siguiendo lo plantado por [44].

Pasadas las primeras 24 horas se puede ver en la figura 4-8 una leve disminución de la supervivencia celular con una tendencia muy similar para todas las dosis. Cabe aclarar que algunos valores dieron mayores a los valores del control, pero como la gráfica que se muestra es el promedio de todas las mediciones de todos los ensayos por eso da menor al control; de igual manera las barras de error reflejan este hecho.

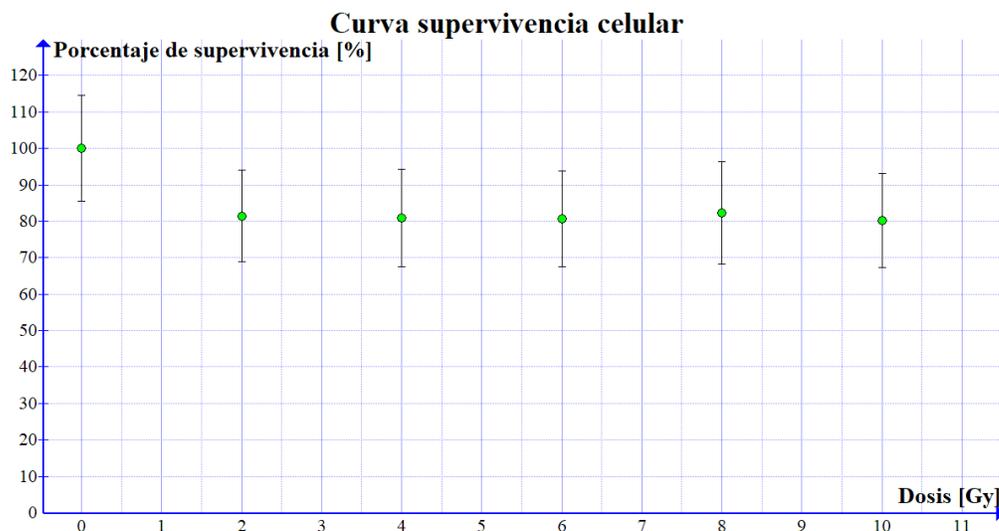


Figura 4-8.: Gráfica porcentaje de supervivencia celular respecto a las dosis para el análisis de todos los ensayos 24 horas después de la irradiación.

Los resultados para la supervivencia de las células después de 4 días de muestra en la figura 4-8, aquí se ve ya una tendencia de disminución de la supervivencia para las dosis altas pero a pesar de ello hay dosis para las cuales aún no se marca el efecto de la radiación.

Finalmente para el análisis del día 7 después de la irradiación figura 4-10, se aprecia un claro decrecimiento en la supervivencia para las dosis más altas y un comportamiento exponencial decreciente lo cual era de esperarse según lo reportado en la literatura [48].

Se grafican también los datos de la curva de supervivencia celular en escala semi-logarítmica figura 4-11, como se reporta usualmente en la literatura [49]. Al tener una tendencia exponencial decreciente los datos, en esta escala toma la forma de una línea recta permitiendo un fácil análisis tanto de las dosis bajas como de las dosis altas.

Los resultados cuantitativos mostrados en la gráfica para el día 7 se muestran en la tabla 4-1. Se puede ver que para las dosis bajas hay una disminución de la supervivencia celular entre 70-60 %, mientras que para las dosis más altas el decrecimiento en la supervivencia es de 13-6 %. En el anexo C se pueden ver los datos del análisis de los demás días de todos los ensayos, y la gráfica unificada para estos resultados en escala lineal y semi-logarítmica.

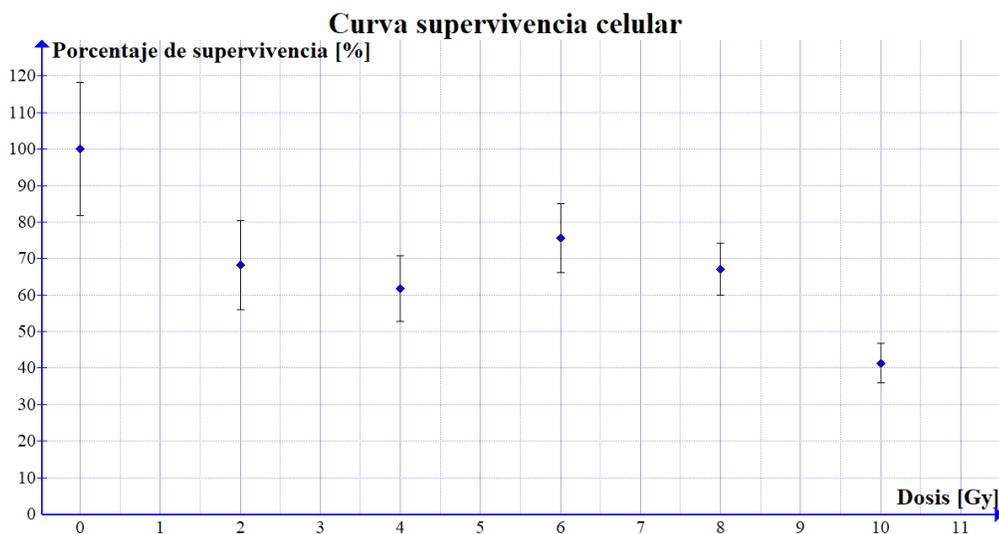


Figura 4-9.: Gráfica porcentaje de supervivencia celular respecto a las dosis para el análisis de todos los ensayos 4 días después de la irradiación.

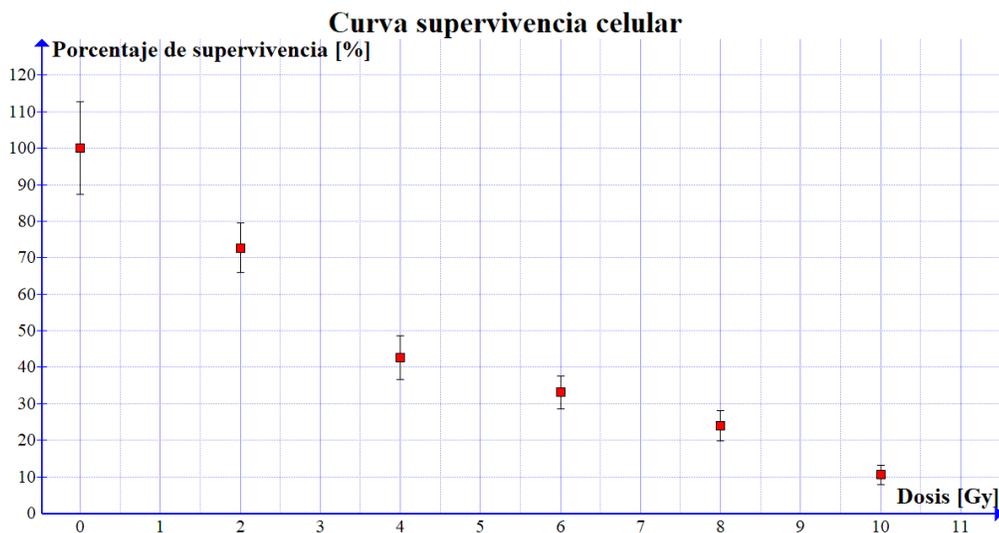


Figura 4-10.: Gráfica porcentaje de supervivencia celular respecto a las dosis para el análisis de todos los ensayos 7 días después de la irradiación.

4.3. Supervivencia celular dosis fraccionada

Como se mencionó en la metodología se irradian los cultivos celulares con dos dosis diferentes, fraccionadas en diferentes días. Para el Esquema 1, la dosis fraccionada es de 5.5 Gy entregada en 5 sesiones en días de por medio y para el Esquema 2, la dosis fraccionada es de 7 Gy entregada en 4 sesiones en días de por medio. Cabe aclarar que se irradiaron los cultivos de la misma manera como se realizan los procedimientos de braquiterapia en el Instituto Nacional de Cancerología, y por ende las irradiaciones se hacían en días hábiles, es decir de lunes a

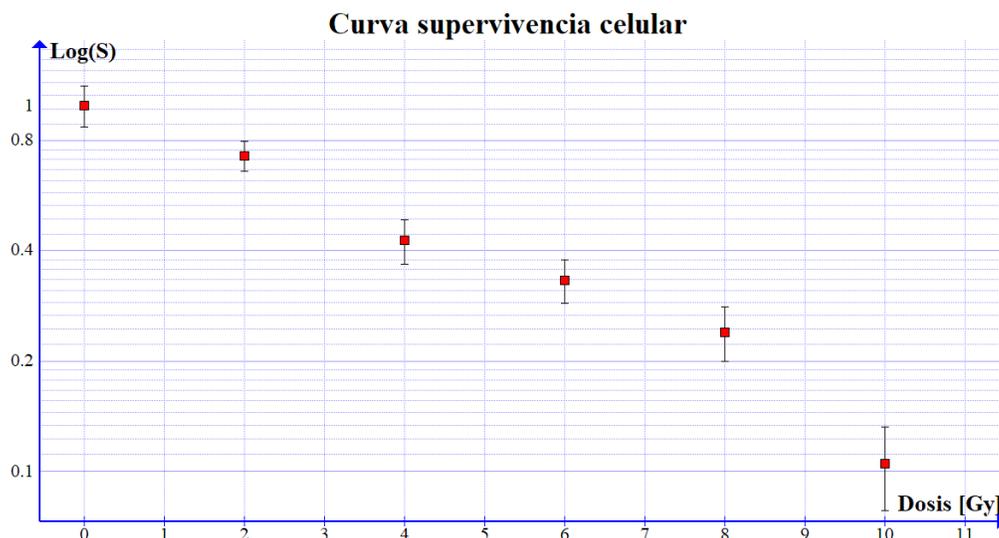


Figura 4-11.: Gráfica en escala semi-logarítmica de la supervivencia celular respecto a las dosis, para todos los ensayos 7 días después de la irradiación.

Dosis [Gy]	Ensayo #1	± [%]	Ensayo #2	± [%]	Ensayo #3	± [%]	Promedio	± [%]
0	100	2.117	100	8.446	100	2.063	100.00	12.626
2	75.77	0.931	80.91	4.558	61.44	1.281	72.71	6.770
4	48.09	0.991	50.07	4.300	29.90	0.631	42.68	5.922
6	37.51	0.715	41.29	3.387	20.65	0.409	33.15	4.512
8	22.88	0.791	32.16	2.548	16.93	0.739	23.99	4.077
10	6.85	0.345	14.59	1.701	10.14	0.657	10.53	2.703

Tabla 4-1.: Resultados de las lecturas de absorbancia para cada una de las dosis entregadas respecto al control de todos los ensayos el día 7 después de la irradiación. Estos valores de absorbancia se relacionan con la supervivencia celular.

viernes, no se irradiaba sábados, domingos o festivos si fuese el caso. Para este experimento nuevamente se realizaron 3 ensayos y cada uno de ellos por duplicado es decir sembrando 2 placas de 96 pozos después de la irradiación, y midiendo cada uno de los pozos tres veces, con el fin de disminuir el error lo más posible.

- **Esquema de irradiación 1 (5.5×5):** A continuación se presenta la captura de las imágenes de las células para cada uno de los días de irradiación de algunos de los ensayos. Para tener una comparación visual respecto a grupo de control en la figura 4-12 se muestra la captura de grupos de control de varios ensayos.

En la figura se pueden ver varios grupos de control para la línea celular SiHa creciendo y llenando los espacios vacíos que encuentran en el matraz. Su morfología es normal

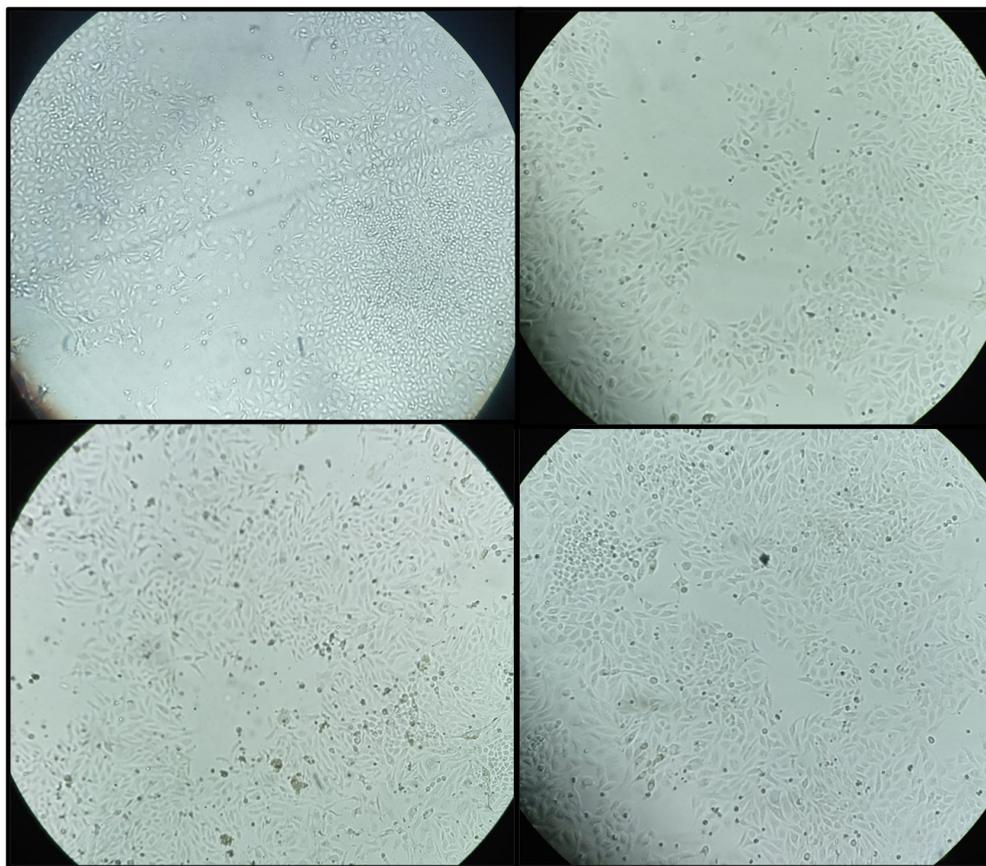


Figura 4-12.: Fotos tomadas a los grupos de control de varios ensayos. Se puede ver una morfología normal según lo reportando en la literatura y un distribución uniforme siempre buscando los espacios libres para multiplicarse.

según como se reporta en la literatura [50].

Teniendo estas imágenes como referencia, vemos en la figura **4-13** fotos de los cultivos celulares irradiados con la dosis de 5.5 Gy durante 5 sesiones. La imagen a) fue tomada el día 1 después de la primera irradiación y tiene una dosis acumulada de 5.5 Gy, la imagen b) fue tomada el día 3 con una dosis acumulada de 11 Gy, la imagen c) fue tomada el día 5 con una dosis acumulada de 16.5 Gy, la imagen d) fue tomada el día 8 con una dosis acumulada de 22 Gy y finalmente la imagen e) fue tomada el día 10 con una dosis acumulada de 27.5 Gy.

En las primera dos fotos (a y b), se puede ver que las células tienen una morfología similar a las del control, pero con algunas células granulosas (oscuras), en especial en la foto c, lo que da a entender que son células que están empezando una suspensión en su ciclo celular y entrando a senectud prematura debido a la radiación se menciona en [51, 52]. En las imágenes d y e se observa que las células presentan deformaciones en sus citoplasma y núcleos por acción de la radiación, a esto se le conoce como catástrofe

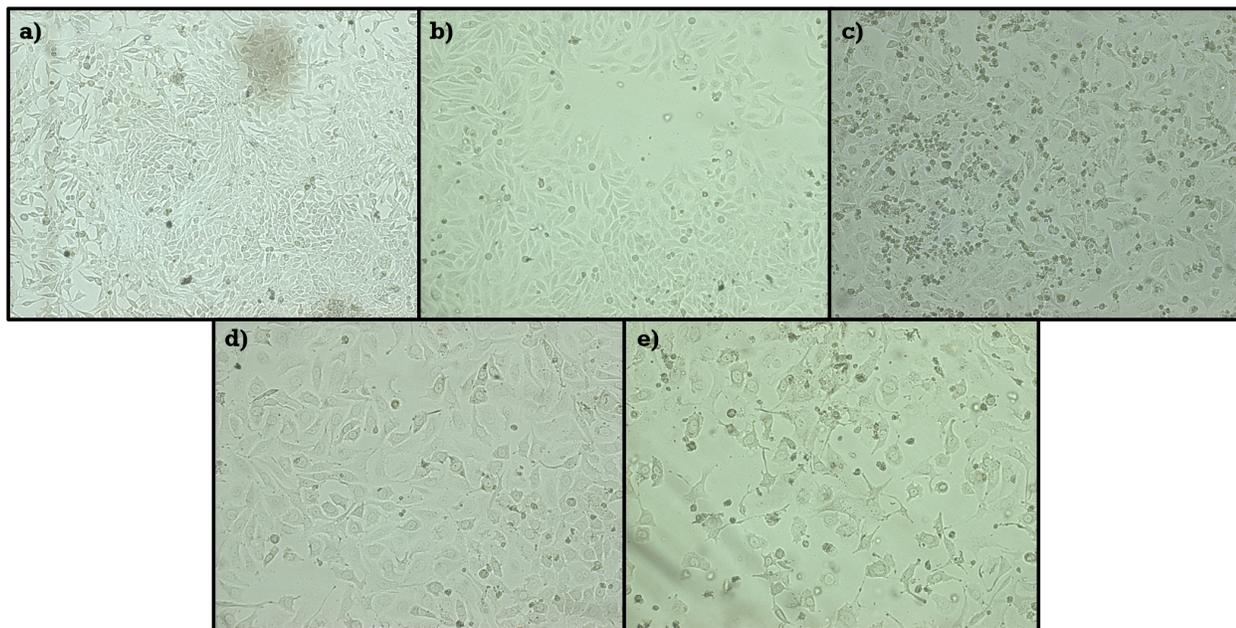


Figura 4-13.: Fotos tomadas a los cultivos celulares después de cada uno de los días de irradiación para el Esquema 1. a) día 1, b) día 3, c) día 5, d) día 8 y e) día 10. De izquierda a derecha aumentan los días y la dosis acumulada.

mitótica y ocurre cuando las células entran a mitosis en una forma inadecuada debido a daños en el ADN no reparado. La muerte celular empieza a ocurrir por una incapacidad física de reproducirse y separar el material genético correctamente, o la pérdida de material genético asociado con este proceso [52]. En la figura e es más evidente el efecto de la catástrofe mitótica ya que más células empiezan a morir lo que genera que pierdan la capacidad de adherirse a la superficie del matraz, por esta razón es que se ven más espacios vacíos en la imagen.

- **Esquema de irradiación 2 (7×4):** Para este fraccionamiento de dosis se presentan también fotos tomadas de los cultivos celulares irradiados, con el fin de hacer una comparación cualitativa respecto a las células de control y ver su respuesta y comportamiento ante la radiación.

En la figura 4-14 se presentan fotos tomadas de ensayos irradiados con 7 Gy durante 4 sesiones. La imagen a) fue tomada para el día 1 de la primera irradiación y tiene una dosis acumulada de 7 Gy, la imagen b) fue tomada el día 3 con una dosis acumulada de 14 Gy, la imagen c) fue tomada el día 5 con una dosis acumulada de 21 Gy, y finalmente la imagen d) fue tomada el día 8 con una dosis acumulada de 28 Gy.

En las primera (foto a), se ve que las células son muy silimares a las fotos del control, no presenta cambios relevantes. En la foto c, se empiezan a ver pequeños cambios morfológicos, algunas células granulosas y otras un poco más grandes con prolongaciones

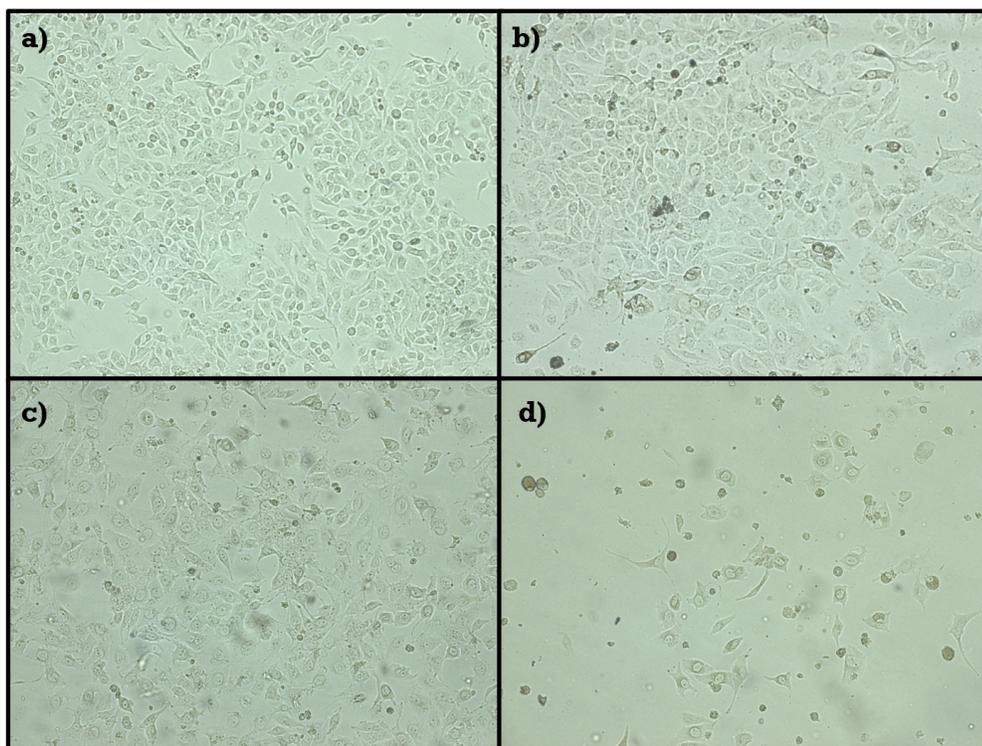


Figura 4-14.: Fotos tomadas a los cultivos celulares después de cada uno de los días de irradiación para la fracción 2. a) día 1, b) día 3, c) día 5 y d) día 8. De izquierda a derecha aumentan los días y la dosis acumulada.

de tipo dendríticas, indicando que pueden estar entrando en senectud prematura al igual que en el caso anterior. Para la foto c, ya se ve un efecto más marcado de la radiación con células cuyo citoplasma está deformado y presentan múltiples núcleos, esto asociado a una catástrofe mitótica, y finalmente en la foto d, se ve como las células muertas ya no están adheridas a la placa y su morfología es completamente diferente a las células de control.

Después de irradiar las células se procedió a analizar la supervivencia de cada una de los esquemas de irradiación mediante el ensayo por MTT. Nuevamente se analizó la supervivencia en el día 4 para descartar comportamientos anómalos, y en el día 7 para ver la respuesta final del cultivo celular a la radiación. En la figura 4-15 se muestra una foto de un cultivo de control y otro del Esquema 2 después de realizar el ensayo por MTT a forma de ejemplo práctico visual.

Se tomaron los datos de cada uno de los ensayos por duplicados y se promediaron con sus respectivas incertidumbres, los datos finales se muestran en la tabla 4-2. Cabe resaltar que en el proceso de análisis por MTT para el Esquema 1, fue necesario repetir el experimento ya que el día final del análisis los cultivos celulares se encontraban contaminados y por ende todas las células muertas. Esta contaminación pudo estar ocasionada por algún factor

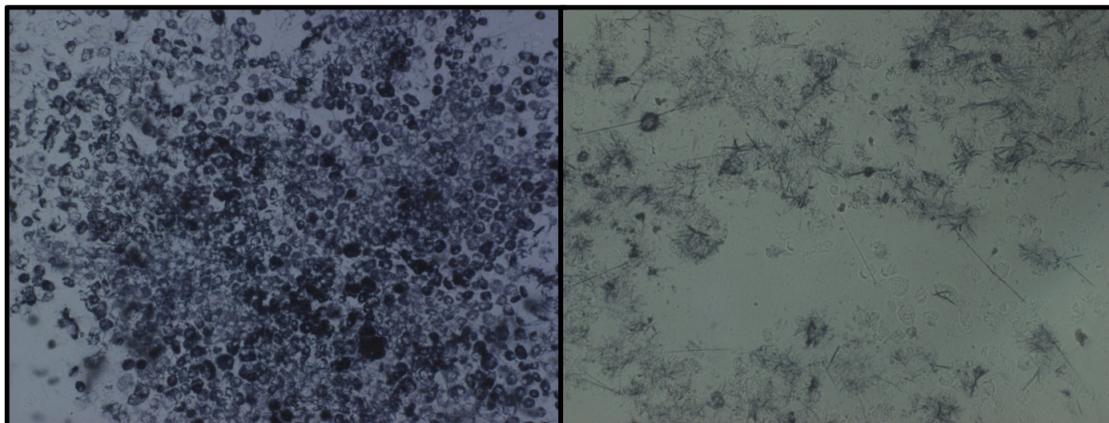


Figura 4-15.: Fotos tomadas al cultivo celular de control (izquierda) y al cultivo del esquema de irradiación 2 (derecha) después de aplicar el ensayo por MTT en el día 7 posterior a la última irradiación. Se muestran estas fotos para ejemplificar el ensayo por MTT.

externo al momento de irradiar los cultivos, ya que estos requerían de dos días más para la última dosis de radiación respecto a los del Esquema 2, en ese tiempo algún agente pudo afectar el cultivo y causar la contaminación.

Dosis [Gy]	Fracción de supervivencia	Incertidumbre [%]
5,5	16.578	0.627
7	5.971	3.029

Tabla 4-2.: Resultados finales de la supervivencia celular para cada uno de los esquemas de irradiación con dosis fraccionadas diferentes. Los valores presentados son el promedio de los valores obtenidos en cada uno de los ensayos con su respectivo cálculo de incertidumbre.

De estos resultados se puede ver que se presenta una diferencia notable entre los dos esquemas de irradiación, ya que la supervivencia celular para el Esquema 2 es 36.1% menor a la del Esquema 1. Esto llevado al contexto clínico da un indicio de que tipo de fraccionamiento de dosis es mejor para el control de cáncer de cuello uterino, ya que la línea celular irradiada (SiHa) tiene una relación directa con este tipo de cáncer.

Por otro lado, se esperaría que la supervivencia celular en los resultados fuera cero o muy cercana a este valor. Esto no sucede ya que al momento de realizar las lecturas de absorbancia algunas células que entran en estado de senescencia prematura (que no mueren pero si pierden la capacidad de multiplicarse), pueden crear MTT formazan y por ende afectar el valor de absorbancia como se observa a la derecha de la figura 4-15, las cuales son células analizadas

el día 7 para el Esquema de irradiación 2.

De igual manera es importante resaltar que pese a que el Esquema 2 tiene una menor supervivencia celular, el resultado tiene una incertidumbre considerablemente alta respecto al valor de supervivencia obtenido, mientras que para el Esquema 1 no es tan significativo su valor de incertidumbre. Esta incertidumbre tan alta se podría disminuir realizando más ensayos para el Esquema 2.

5. Conclusiones y discusión

Las conclusiones se presentan en torno a los objetivos planteados para este trabajo de investigación.

Respecto a evaluar la supervivencia de la línea celular SiHa al ser irradiada con una fuente de Ir-192 se cumplió satisfactoriamente con este objetivo, permitiendo desarrollar una metodología para los controles de calidad necesarios antes de la irradiación celular. También permitiendo aplicar y modificar para esta investigación la metodología desarrollada por Rafael Chona [44] para el cultivo, conteo y análisis in vitro de la línea celular SiHa.

En los controles de calidad para la verificación de la actividad de la fuente y tiempos de tránsito se aplicaron los protocolos establecidos en el Instituto Nacional de Cancerología, adicionándole el cálculo de incertidumbre de los valores obtenidos. En la verificación de la actividad de la fuente se tuvo un error del 0.9104 % y para el tiempo de tránsito se obtuvo un porcentaje de error del 3.15 % figura 4-1. Para la determinación de la dosis a entregar se pudo verificar que al momento de irradiar los cultivos celulares había una subdosificación del 15 % aproximadamente, por lo que se consiguió corregir este error y garantizar la entrega de la dosis entre un 95 % y un 100 % figura 4-6.

Sobre la metodología establecida para el sembrado, irradiación y posterior análisis de la supervivencia celular se llevó a cabo con éxito, modificando para este caso la metodología desarrollada por [44], ya que en ese trabajo la irradiación la realizaron por medio de un acelerador lineal con las células en suspensión, mientras que en este trabajo se realizó la irradiación con una fuente radiactiva (Ir-192) en cultivos celulares en monocapa, obteniendo así una curva de supervivencia celular como se muestra en la figura 4-10, y mostrando que es eficiente el efecto de la radiación de este tipo de fuentes sobre la supervivencia de la línea celular SiHa. Adicionalmente, se mostró que el ensayo por MTT presenta mejores resultados respecto al ensayo clonogénico, por lo menos para este tipo de metodología e irradiación implementada.

Referente a la determinación de la supervivencia celular usando dos Esquemas de irradiación diferentes, con dos dosis fraccionadas distintas, se puede ver de la tabla 4-2 que el Esquema fraccionado 2 (7 Gy en 4 sesiones) tiene una menor supervivencia celular respecto al Esquema fraccionado 1 (5.5 Gy en 5 sesiones), pero con un valor de incertidumbre significativamente alto en relación con el valor determinado, por lo que para disminuir ésta incertidumbre es

necesario realizar y repetir varias veces el ensayo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se puede concluir que el aporte al área de la radiobiología es positivo, ya que se deja un precedente para el estudio de la supervivencia de otras líneas celulares asociadas a tipos de cáncer que son tratados mediante procedimiento de braquiterapia con una fuente de Ir-192. Asimismo, el impacto en el ámbito clínico es favorable, ya que se puede ver que la línea celular SiHa, la cual tiene una relación directa con el cáncer de cérvix, experimenta una alta respuesta a la radiación, es decir una supervivencia celular baja, en especial para un esquema de irradiación de 7 Gy en 4 sesiones.

Finalmente, es importante mencionar que las barras de error que se presentan en la gráfica de la curva de supervivencia celular (figura 4-11), como en los valores de error de los Esquemas de fraccionamiento (tabla 4-2), están relacionadas con la incertidumbre calculada y se pueden disminuir repitiendo los ensayos planteados en este trabajo de investigación.

A. Anexo: Mediciones de la verificación de la actividad de la fuente

A continuación se presentan los datos obtenidos en el proceso de verificación de la actividad de la fuente.

Posición de la fuente Ir-192 [cm]	Lectura 1 [nC]	Lectura 2 [nC]	Lectura 3 [nC]	Promedio Lecturas cargas [nC]	Promedio lecturas corriente [nA]
126.10	259.20	259.20	259.20	259.20	51.84
126.00	259.40	259.40	259.30	259.37	51.87
125.90	259.40	259.40	259.40	259.40	51.88
125.80	259.50	259.50	259.50	259.50	51.90
125.70	259.60	259.60	259.60	259.60	51.92
125.60	259.60	259.60	259.60	259.60	51.92
125.50	259.60	259.60	259.60	259.60	51.92
125.40	259.50	259.50	259.50	259.50	51.90
125.30	259.50	259.50	259.50	259.50	51.90
125.20	259.40	259.40	259.40	259.40	51.88
125.10	259.20	259.20	259.20	259.20	51.84
Punto de máxima respuesta de la cámara de Ionización				259.60	51.92

Tabla A-1.: Datos obtenidos de las mediciones de carga y corriente para la verificación de la actividad de la fuente. En rojo se resalta el punto máximo de lectura de la cámara de ionización.

B. Anexo: Mediciones de los tiempos estacionarios y tiempos de tránsito de la fuente

A continuación se presentan los datos obtenidos en el proceso de verificación del tiempo de tránsito de la fuente. Se presentan las mediciones en los tiempos estacionarios de la fuente y las mediciones para cuando la fuente radiactiva esta en tránsito, es decir mientras entra y sale del robot. Para los valores calculados de incertidumbre que fueron menores a la sensibilidad del equipo de medición, se remplazaron por la sensibilidad del electrometro siendo ésta de 0.01 nC.

Tiempo Estacionario							
Tiempo [s]	Q1 [nC]	Q2 [nC]	Q3 [nC]	Q Promedio [nC]	Incertidumbre Q	I estacionaria [nA]	Incertidumbre I
10	3.70	3.70	3.70	3.70	0.010	0.370	4.70E-03
20	7.30	7.30	7.30	7.30	0.010	0.365	2.33E-03
30	11.00	11.00	11.00	11.00	0.010	0.367	1.56E-03
40	14.60	14.70	14.70	14.67	0.033	0.367	1.75E-03
50	18.30	18.30	18.30	18.30	0.010	0.366	9.32E-04
60	21.90	21.90	22.00	21.93	0.033	0.366	1.16E-03
70	25.60	25.60	25.60	25.60	0.010	0.366	6.65E-04
80	29.30	29.30	29.20	29.27	0.033	0.366	8.74E-04
90	32.90	32.90	32.90	32.90	0.010	0.366	5.17E-04
100	36.80	37.80	37.80	37.47	0.333	0.375	3.71E-03

Tabla B-1.: Datos obtenidos de las mediciones de carga y corriente para los tiempos estacionarios, cuando la fuente esta en una posición fija.

Tiempo en transito							
Tiempo [s]	Q1 [nC]	Q2 [nC]	Q3 [nC]	Q Promedio [nC]	Incertidumbre Q	Tiempo Efectivo [s]	Incertidumbre Tiempo Efectivo
10	4.09	4.15	4.04	4.09	0.03	11.06	0.23
20	7.89	7.90	7.97	7.92	0.03	21.70	0.21
30	11.45	11.68	11.68	11.60	0.08	31.65	0.34
40	15.64	15.21	15.46	15.34	0.13	41.82	0.54
50	19.21	19.46	19.31	19.33	0.07	52.81	0.33
60	23.02	23.34	23.06	23.14	0.10	63.30	0.48
70	26.73	27.21	27.12	27.02	0.15	73.88	0.54
80	31.13	31.15	31.00	31.09	0.05	84.99	0.33
90	34.12	34.87	34.07	34.35	0.26	93.98	0.84
100	38.85	38.56	37.75	38.39	0.33	102.46	1.89

Tabla B-2.: Datos obtenidos de las mediciones de carga para la fuente en tránsito. Se resalta en azul claro los valores de tiempo efectivo, los cuales se obtienen de la razón entre las mediciones del tiempo en tránsito sobre el tiempo estacionario.

C. Anexo: Resultados del análisis de todos los ensayos en cada uno de los días correspondientes.

A continuación se presentan las tablas y la gráfica unificada de todos los ensayos analizados a las 24 horas, al día 4 y al día 7 después de la irradiación.

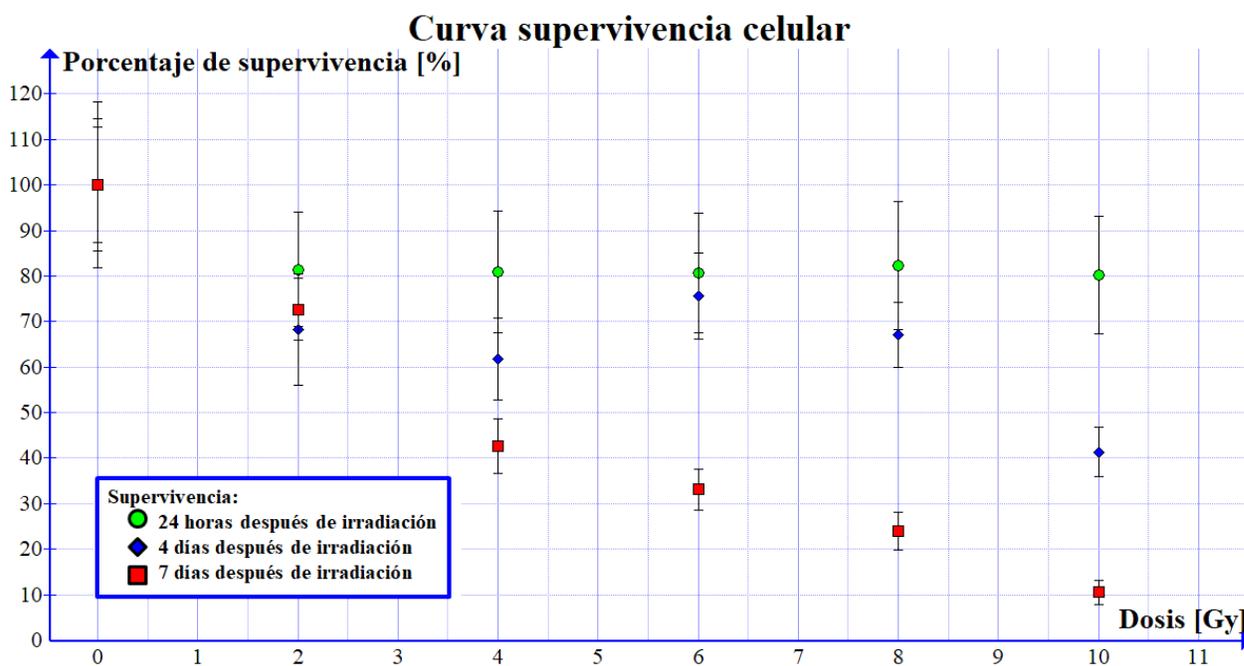


Figura C-1.: Gráfica en escala lineal del porcentaje de supervivencia celular respecto a las dosis para el análisis de todos los ensayos 24 horas, 4 días y 7 días después de la irradiación.

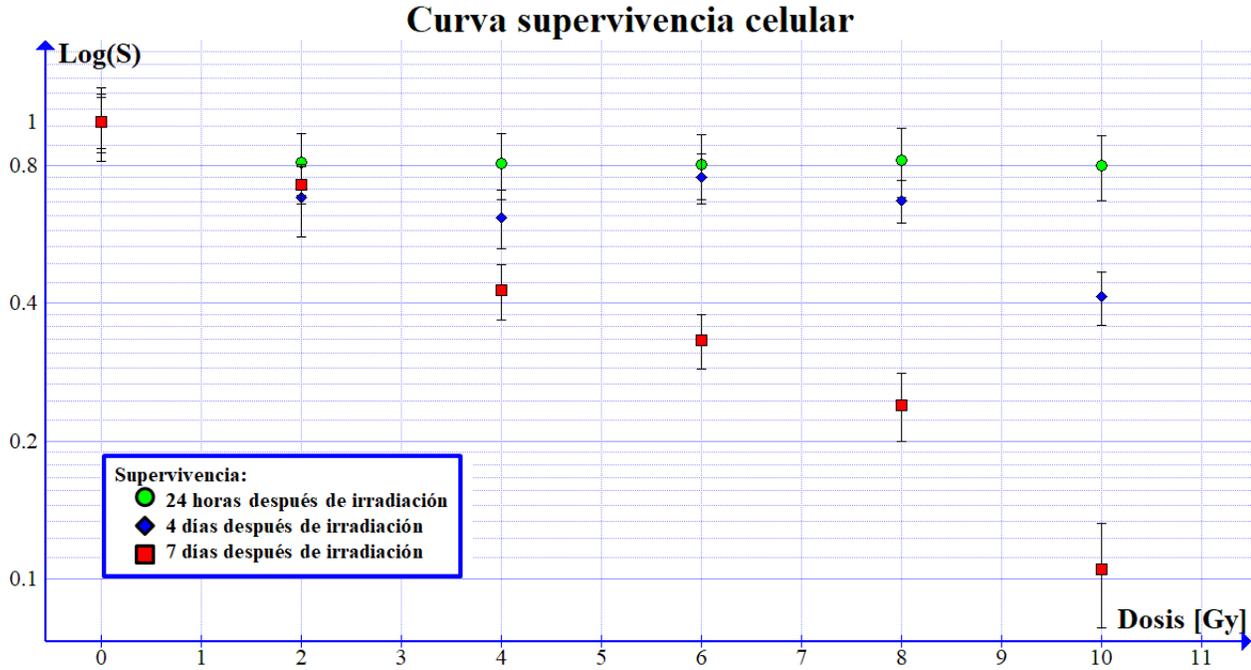


Figura C-2.: Gráfica en escala semi-logarítmica del porcentaje de supervivencia celular respecto a las dosis para el análisis de todos los ensayos 24 horas, 4 días y 7 días después de la irradiación.

Dosis [Gy]	Ensayo #1	± [%]	Ensayo #2	± [%]	Ensayo #3	± [%]	Promedio	± [%]
0	100	3.460	100	7.997	100	3.110	100.00	14.567
2	89.18	3.146	98.66	7.709	56.45	1.668	81.43	12.523
4	77.05	3.442	96.14	7.693	69.58	2.189	80.92	13.325
6	65.81	2.786	97.37	8.220	78.60	2.155	80.59	13.161
8	77.10	3.733	79.76	8.261	89.93	2.154	82.26	14.148
10	83.95	3.769	83.89	7.188	72.78	2.038	80.21	12.995

Tabla C-1.: Resultados de las lecturas de absorbancia para cada una de las dosis entregadas respecto al control de todos los ensayos 24 horas después de la irradiación. Estos valores de absorbancia se relacionan con la supervivencia celular.

Dosis [Gy]	Ensayo #1	± [%]	Ensayo #2	± [%]	Ensayo #3	± [%]	Promedio	± [%]
0	100	2.616	100	12.520	100	3.130	100.00	18.266
2	74.05	2.916	85.23	8.118	45.37	1.211	68.22	12.245
4	97.96	2.868	42.56	4.358	44.62	1.733	61.71	8.960
6	100.20	2.780	57.21	4.824	69.35	1.891	75.59	9.495
8	90.63	2.384	36.84	3.329	73.57	1.439	67.01	7.153
10	39.97	1.504	41.77	3.063	42.27	0.903	41.34	5.471

Tabla C-2.: Resultados de las lecturas de absorbancia para cada una de las dosis entregadas respecto al control de todos los ensayos 4 días después de la irradiación. Estos valores de absorbancia se relacionan con la supervivencia celular.

D. Anexo: Resultados del ensayo clonogénico

A continuación se presentan capturas de imágenes y los resultados obtenidos para determinar la supervivencia y capacidad de proliferación celular a partir del ensayo clonogénico.

Dosis [Gy]	Fracción de supervivencia	
	Ensayo 1	Ensayo 2
0	1	1
2	1.041667	0.911514
4	1.041667	0.039179
6	0.115741	0.005597
8	0.016667	0
10	0	0

Tabla D-1.: Resultados de la fracción de supervivencia para los dos ensayos clonogénicos realizados. Se puede observar que los resultados obtenidos no son acordes a lo esperado según la literatura.

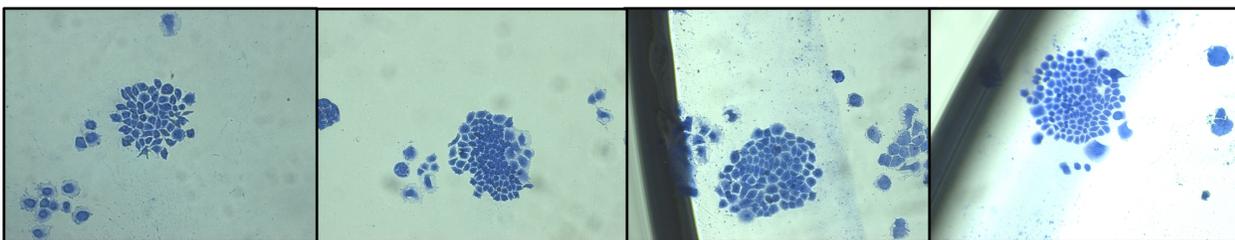


Figura D-1.: Fotos tomadas de diferentes cultivos celulares de control para el ensayo clonogénico.

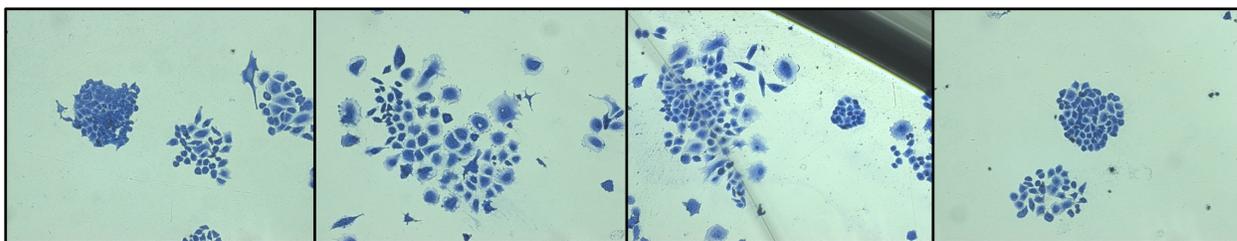


Figura D-2.: Fotos tomadas de diferentes cultivos celulares irradiados con una dosis de 2 Gy para el ensayo clonogénico.

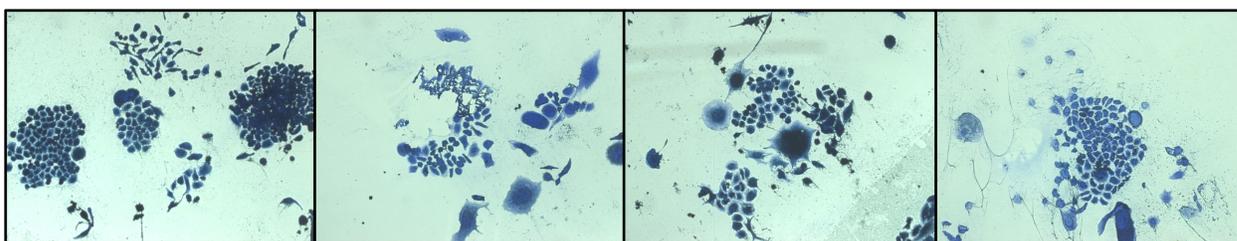


Figura D-3.: Fotos tomadas de diferentes cultivos celulares irradiados con una dosis de 4 Gy para el ensayo clonogénico.

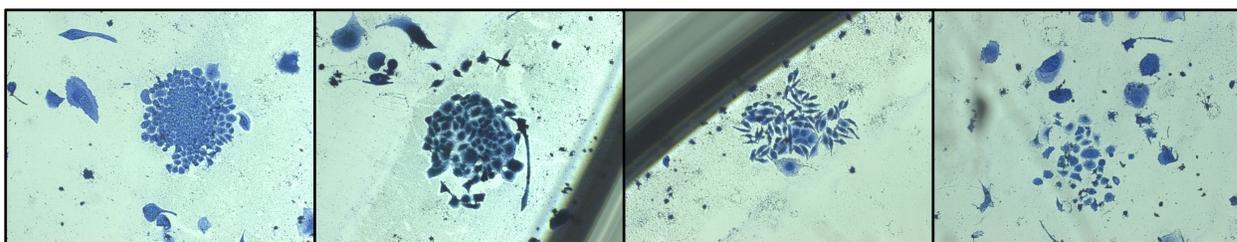


Figura D-4.: Fotos tomadas de diferentes cultivos celulares irradiados con una dosis de 6 Gy para el ensayo clonogénico.

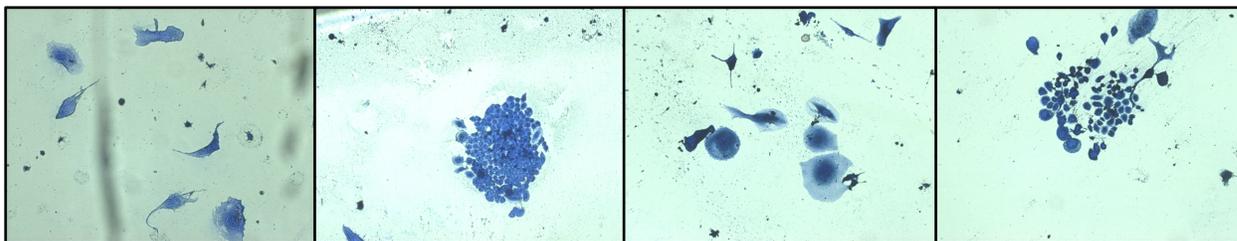


Figura D-5.: Fotos tomadas de diferentes cultivos celulares irradiados con una dosis de 8 Gy para el ensayo clonogénico.

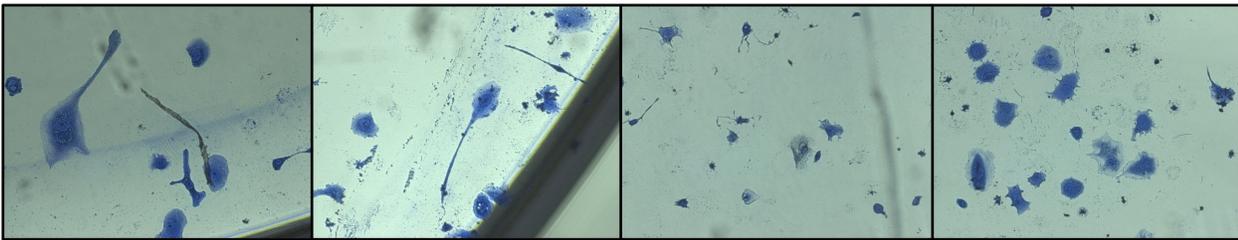


Figura D-6.: Fotos tomadas de diferentes cultivos celulares irradiados con una dosis de 10 Gy para el ensayo clonogénico.

E. Anexo: Consideraciones éticas

Esta es una investigación biomédica acorde con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. El estudio se realizó de acuerdo a normas de Buena Práctica Clínica (BPC) y la resolución N° 8430 de 1993 del Ministerio de Salud que establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en humanos (Min Salud 1993), Artículo 11. Este proyecto se clasifica como “investigación sin riesgo”, debido a que el proyecto se realizó sobre líneas celulares comerciales utilizadas con fines de investigación. La responsabilidad del estudio recae sobre el Investigador principal y demás investigadores, quienes cuentan con los recursos técnicos y científicos para realizarlo. El investigador principal y demás investigadores de este trabajo declaran no tener ningún conflicto de interés. El proyecto fue sometido y aprobado por el comité de ética de la Universidad Nacional, dando el aval positivo para la realización de l trabajo de investigación.

Seguridad: La investigación fue realizada por profesionales con conocimiento y experiencia en el área de radioterapia, cultivo celular, y biología molecular, lo que permite garantizar la calidad de los resultados obtenidos en la misma. Tanto los ensayos como los insumos utilizados para los experimentos propuestos no revisten ningún tipo de riesgo para la salud humana y fueron manipulados siguiendo estrictas normas de bioseguridad. Las irradiaciones fueron realizadas bajo la supervisión de un miembro del grupo de física médica del Instituto Nacional de Cancerología y fuera del horario laboral, por lo que no presentaron un problema para el flujo diario de pacientes de la institución.

Consideraciones ambientales: Los procedimientos de este estudio no tuvieron gran impacto sobre el medio natural, ya que no se trabajó con especies animales, ni vegetales y no hay una manipulación de recursos biológicos que pueda alterar el medio ambiente en el futuro. Igualmente, en este estudio no se trabajó con sustancias químicas a gran escala que pudieran tener algún efecto dañino en el medio ambiente o en la salud humana, ni a corto ni a largo plazo. El trabajo experimental se desarrolló en el laboratorio del grupo de investigación en Biología del Cáncer, donde se adelantan protocolos de investigación del mismo tipo y en se tienen en cuenta las buenas prácticas de laboratorio. El manejo de los desechos se hizo atendiendo normas vigentes en la Institución y en el país en materia de bioseguridad, como lo dicta la resolución 8430 de 1993, Art. 63. Confidencialidad: No aplica.

Bibliografía

- [1] Ervin B Podgorsak et al. Radiation oncology physics. *Vienna: International Atomic Energy Agency*, 2005.
- [2] Orlando Argoty Eraso. Comparación de dosimetría clínica en braquiterapia HDR convencional y 3d para cáncer de cuello uterino. *Departamento de Física*, 2018.
- [3] A Brosed Serreta and MC Lizuain Arroyo. Fundamentos de física médica, volumen 3: Radioterapia externa. *Bases físicas, equipos, determinación de la dosis absorbida y programa de garantía de calidad*, 2012.
- [4] Antonio Brosed. Fundamentos de física médica vol. 1 medida de la radiación, ed. *Sociedad Española de Física Médica (SEFM)*, 2011.
- [5] Elsa Yazmin Leon Marroquin et al. Caracterización y validación de la película gafchromic ebt3 para control de calidad en tratamientos de radiocirugía utilizando dos sistemas ópticos. 2016.
- [6] Armplilia Sureka. *Radiation Biology for Medical Physicists*. Taylor & Francis Group, 2017.
- [7] Eric J Hall and Amato J Giaccia. *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- [8] Carol Paola Melo Torres et al. Implementación del ensayo mtt (bromuro de 3-(3, 4-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio) en líneas celulares tumorales y determinación de la viabilidad celular de análogos de ácidos nucleico. 2017.
- [9] Omar Rodrigo García García et al. Dependencia del daño indirecto al ADN en función de la temperatura estudiado mediante métodos Monte Carlo track structure. Master's thesis, 2020.
- [10] Jeffrey F Williamson and DJ Brenner. Physics and biology of brachytherapy. *Principles and practice of radiation oncology*, 5, 2008.
- [11] David J Brenner. Radiation biology in brachytherapy. *Journal of surgical oncology*, 65(1):66–70, 1997.

- [12] Subir Nag, Granger R Scruggs, and JA Kalapurakal. Clinical aspects and applications of high-dose-rate brachytherapy. *Principles and Practice of Radiation Oncology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins*, pages 560–582, 2008.
- [13] Rajamanickam Baskar, Kuo Ann Lee, Richard Yeo, and Kheng-Wei Yeoh. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences*, 9(3):193, 2012.
- [14] Isabel C Garcés, Diana C Rubio, and Isabel C Scarinci. Factores asociados con el tamizaje de cáncer de cuello uterino en mujeres de nivel socioeconómico medio y bajo en bogotá, colombia. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(1):7–16, 2012.
- [15] In stituto. Casos nuevos de cáncer en el instituto nacional de cancerología, colombia, 2002. *Revista Colombiana de cancerología*, 7(3):4–19, 2003.
- [16] Bernard Fertil and Edmond-Philippe Malaise. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 7(5):621–629, 1981.
- [17] David J Carlson, Robert D Stewart, X Allen Li, Kristofer Jennings, Jian Z Wang, and M Guerrero. Comparison of in vitro and in vivo α/β ratios for prostate cancer. *Physics in Medicine & Biology*, 49(19):4477, 2004.
- [18] Radivoj Jadrić, Sabaheta Hasić, Emina Kiseljaković, Jozo Corić, Besim Prnjavorac, and Mira Winterhalter-Jadrić. Blood iron stores reduction affects lipoprotein status—a potential benefit of blood donation. *Medicinski Glasnik: Official Publication of the Medical Association of Zenica-doboj Canton, Bosnia and Herzegovina*, 8(1):146–150, 2011.
- [19] Eric J Hall, Amato J Giaccia, et al. *Radiobiology for the Radiologist*, volume 6. Philadelphia, 2006.
- [20] Juan Carlos Roa, Patricia Garcia, Jorge Gomez, Wanda Fernández, Fancy Gaete, Arturo Espinoza, Alejandro Lepetic, and Eugenio Suarez. Hpv genotyping from invasive cervical cancer in chile. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 105(2):150–153, 2009.
- [21] Antony Palmer, David Bradley, and Andrew Nisbet. Physics-aspects of dose accuracy in high dose rate (hdr) brachytherapy: source dosimetry, treatment planning, equipment performance and in vivo verification techniques. *Journal of contemporary brachytherapy*, 4(2):81, 2012.
- [22] Dan Serbanescu. International atomic energy agency, vienna international centre po box 100, a-1400 vienna, austria.

- [23] DR Dance, S Christofides, ADA Maidment, ID McLean, and KH Ng. Diagnostic radiology physics: A handbook for teachers and students. endorsed by: American association of physicists in medicine, asia-oceania federation of organizations for medical physics, european federation of organisations for medical physics. *International Atomic Energy Agency (IAEA): IAEA*, 2014.
- [24] Pedro Andreo, David T Burns, Alan E Nahum, Jan Seuntjens, and Frank Herbert Attix. *Fundamentals of ionizing radiation dosimetry*. John Wiley & Sons, 2017.
- [25] Encyclopedia Britannica. Gamma rays, n.d.
- [26] J.T. Bushberg, J.A. Seibert, E.M. Jr Leidholdt, and J.M. Boone. *The essential physics of medical imaging*. Lippincott Williams Wilkins, 2012.
- [27] AD Riley, TL Pike, JA Micka, RK Fulkerson, and LA DeWerd. Determination of air-kerma strength for the 192ir gammamed ix pulsed-dose-rate brachytherapy source. *Medical Physics*, 40(7):071732, 2013.
- [28] Tomas Emanuel Spretz. *Dosimetría de campos pequeños de fotones en radioterapia. Intercomparación entre distintos detectores*. PhD thesis, Universidad Nacional de Cuyo, 2016.
- [29] Luis Medina, Edgardo Garrigo, Daniel Venencia, Alberto Adrada, and Maximiliano Filipuzzi. Characterization of radiochromic films ebt3 by means of the scanner vidar dosimetry pro red and epson 10000-xl use. 2014.
- [30] Sofía S Dropsi. *Diseño de un fantoma compatible con imágenes para verificaciones en braquiterapia de alta tasa de dosis tridimensional*. PhD thesis, Universidad Nacional de Cuyo, 2018.
- [31] Angie Vanesa Chisica Avila and Dayan Alejandra Sánchez Aguilera. Estudio de los mecanismos de muerte celular inducidos por tres flavonoides de chromolaena tacotana sobre células de cáncer de próstata (pc3) y cérvix (siha)—investigación. 2022.
- [32] Brosed Serreta and Guirado Llorente. Fundamentos de física médica-vol. 8. radiobiología principios de oncología, 2016.
- [33] Michael C. Joiner and Albert van der Kogel. Basic clinical radiobiology. 2009.
- [34] Eric J. Hall and Amato J. Giaccia. Radiobiology for the radiologist. *Lippincott Williams & Wilkins*, 2018.
- [35] J. Smith, M. García, A. Pérez, and R. González. Estudio sobre la dosis de radiación necesaria para producir la muerte celular en líneas celulares de cáncer de pulmón. *Revista de Investigación en Radiobiología*, 25(2):45–52, 2018.

- [36] Tim Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2):55–63, 1983.
- [37] Clemencia de Castro de Pardo. Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando la prueba del mtt. *Fundación Universitaria San Martín, Bogotá*, 2006.
- [38] Carlos Manzano Basalo. Estudio in vitro de la supervivencia de células tumorales irradiadas con rayos x. 2019.
- [39] Michael C Joiner and Albert J van der Kogel. *Basic clinical radiobiology*. CRC press, 2018.
- [40] Nicolaas AP Franken, Hans M Rodermond, Jan Stap, Jaap Haveman, and Chris Van Bree. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5):2315–2319, 2006.
- [41] R Alfonso, P Andreo, M Brunetto, E Castellanos, E Jimenez, D Venencia, and I Silvestre. Physical aspects of radiotherapy quality assurance: quality control protocol-update of iaea tecdoc-1151. Technical report, 2010.
- [42] David S Smith and Michael G Stabin. Exposure rate constants and lead shielding values for over 1,100 radionuclides. *Health physics*, 102(3):271–291, 2012.
- [43] CM Díaz-Aguirre, E Echevarría-Pérez, and SG Fuentes-Mariles. Accesorios individualizados para radioterapia. *Rev Med Hosp Gen Méx*, 75(2):123–7, 2012.
- [44] Rafael Esteban Chona Perea. Creación de un protocolo para la construcción de curvas de supervivencia sobre la línea celular siha utilizando un acelerador lineal de uso clínico. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2023.
- [45] Mayra Angélica de León Alfaro. Distribución de la dosis en campos pequeños con ebt3.
- [46] Jony M Geraldo, Lídia M Andrade, Luciana B Nogueira, Cássia T Grundmann, Telma CF Fonseca, Bruno GS Gomes, Miguel TT Leite, Arnaldo Mafra, Kennedy B Gonçalves, Clascidia A Furtado, et al. Monte carlo simulation and dosimetry measurements of an experimental approach for in vitro hdr brachytherapy irradiation. *Applied Radiation and Isotopes*, 172:109666, 2021.
- [47] Jony M Geraldo, Sérgio Scalzo, Daniela S Reis, Thiago L Leão, Silvia Guatimosim, Luiz O Ladeira, and Lídia M Andrade. Hdr brachytherapy decreases proliferation rate and cellular progression of a radioresistant human squamous cell carcinoma in vitro. *International journal of radiation biology*, 93(9):958–966, 2017.

-
- [48] Serra Kamer, Qing Ren, and Adam P Dicker. Differential radiation sensitization of human cervical cancer cell lines by the proteasome inhibitor velcade (bortezomib, ps-341). *Archives of gynecology and obstetrics*, 279(1):41–46, 2009.
- [49] Karl Buch, Tanja Peters, Thomas Nawroth, Markus Sanger, Heinz Schmidberger, and Peter Langguth. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple mtt assay-a comparative study. *Radiation oncology*, 7(1):1–6, 2012.
- [50] Jenny Valentina Hernández Barrero. Evaluaci3n de la actividad citot3xica in vitro del extracto etan3lico de petiveria alliacea l. sobre la línea celular tumoral siha. 2021.
- [51] Judith Campisi and Fabrizio d’Adda di Fagagna. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(9):729–740, 2007.
- [52] Pablo Alejandro Quintero Mejía. Estudio in vitro de la supervivencia en c3lulas tumorales irradiadas con un acelerador lineal de uso clínico. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2012.