CURVAS DE SOBREVIDA CELULAR PARA CELULAS IRRADIADAS CON LU-177

DIANA MARCELA ROLDAN RUEDA

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TITULO MAESTRÍA EN FISICA MEDICA

DIRIGIDO POR:

PhD. FABIO ANCIZAR ARISTIZABAL

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FISICA

Bogotá, 2011

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme hacer este trabajo.

A mi familia por siempre estar ahí.

A el profesor Fabio por su paciencia, comprensión, su mente abierta y compromiso con la ciencia para realizar trabajos como este.

A Juan Felipe Castro por animarme a seguir siempre adelante.

Al Instituto Nacional de Cancerología, servicio de medicina nuclear por facilitarme el material de trabajo y los conocimientos.

A mis compañeros de Maestría Edwin Rozo y Mauricio Arciniegas por darme su opinión y sus consejos profesionales.

A Cesar Villamil por siempre escuchar mi dudas y ayudarme a aclararlas así como facilitarme lo elementos que necesitaba.

A el grupo de Farmacogenetica del Cáncer por sus ayuda en mi curva de aprendizaje sobre cultivos celulares, sus opiniones y sobre todo por acogerme y permitirme trabajar en su grupo.

Resumen

En este trabajo se midió la curva de sobrevida celular para la línea A 549, carcinoma de pulmón, irradiada con una solución de Lu-177 libre en el medio de cultivo celular. El ensayo fue montado en placas de 96 pozos donde solo 15 pozos fueron tratados con diferentes actividades que variaron entre *50μCi* y *600μCi* y fueron encubadas entre 1 y 6 días a 37°C, 5% de CO_2 y 100% de humedad relativa. La fracción de supervivencia celular se midió encubando las células con rezasurina durante 4 horas y midiendo las unidades de fluorescencia relativa. La dosis se calculo a partir de la teoría de calculo para dosimetría interna, D=ÃS, donde Ã(MBq S) es la actividad acumulada en el pozo tratado y S (mGy/MBq S) es tomado de [Laconelli]. Se encontro que α/β=154.1 ±0.56 Gy.

Abstract

In this work the cell survival curve for line A 549, lung carcinoma was measured. It was irradiated with a solution of Lu-177 free in the cell culture medium. It was mounted in 96-well plates where only 15 wells were treated with different activities ranging from 50µCi to 600µCi and were incubated between 1 and 6 days at 37 ° C, 5% CO2 and 100% relative humidity. Incubating the cells with rezasurina for 4 hours and measuring the relative fluorescence units was measured the cell survival fraction. The dose was calculated from the internal dosimetry calculation theory, D = ÃS, where Ã (MBq S) is the cumulative activity in the well treated and S (mGy / MBq S) is taken from [Laconelli]. It was found that α / β = 154.1 ± 0.56 Gy.

Tabla de Contenido

Introducción 5
Objetivo 9

1. Fundamentos Teóricos 9
1.1 Radiaciones Ionizantes 10
1.2 Cálculo de la Dosis 13
1.2.1 Dosimetria a nivel de Vóxel. 17
1.3 Interacción Radiación-Célula 19
1.4 Línea Celular 26

2. Montaje experimental 28
2.1 El cultivo cellular 29
2.2 La irradiación de las células. 30
2.2.1 Radioprotección 34
2.3 Medidas de viabilidad celular. 36

3. Resultados y Discusión. 38

Conclusiones 49

Sugerencias 51

Bibliografía 52

Anexo 55

Introducción

Las radiaciones ionizantes son un fenómeno natural que ha causado gran interés desde su descubrimiento pues históricamente es el hallazgo que más rápido ha sido aplicado en la industria y la medicina. Las radiaciones ionizantes fueron descubiertas en 1895 por Wilhelm Conrad Roentgen, quien experimentando con cargas eléctricas descubrió los rayos X, poco tiempo después, entre 1896 y 1897, Henri Becquerel, María Curie y Pierre Curie descubrieron la radiactividad natural, lo que dio paso al entendimiento de la estructura de la materia: el átomo.

Aunque en principio los dos descubrimientos parecían no tener mucho en común por la diferencia de sus orígenes, su comportamiento físico es el mismo: energía que se transfiere a través de la materia o el espacio y que es capaz de ionizar la materia. Los usos para este descubrimiento no dieron espera, pero dieron como resultado efectos adversos por lo que el mundo entendió rápidamente que el uso indiscriminado de las radiaciones podía producir enfermedades como cáncer. Aun así, las aplicaciones que las radiaciones tienen en campos como la medicina no podían ignorarse, sin herramientas como los rayos X, la medicina no sería lo que hoy en día es.

Las radiografías del cuerpo humano no es el único uso de las radiaciones ionizantes en medicina. En medicina se utilizan radiaciones

ionizantes para uso diagnóstico y tratamientos principalmente de cáncer. En un centro médico es posible encontrar tres formas diferentes de irradiar a los pacientes: los aceleradores, las fuentes cerradas y las fuentes abiertas. Los aceleradores y las fuentes cerradas de radiación son las más populares pues presentan menos riesgo, y permiten hacer tratamientos localizados. Las fuentes abiertas son utilizadas en medicina nuclear y permiten hacer estudios dinámicos y funcionales de los pacientes así como algunos tratamientos.

Los tratamientos con fuentes abiertas no son muy comunes y están condicionados al tipo de cáncer. Para realizar un tratamiento con fuentes abiertas las células cancerígenas deben presentar una sobrepoblación de receptores que permita que la biodistribución del material sea preferente por el tipo de célula que se quiere tratar. Un ejemplo de esto es el cáncer de tiroides donde las células procesan naturalmente el yodo, el cuerpo no discrimina entre yodo estable o radioactivo por lo que a los pacientes se les suministra I-131, un isótopo de yodo que es captado por las células malignas y las destruye. En otros casos como el de tumores neuroendocrinos, en los que las células son receptoras de somatostatina, es necesario crear un radiofármaco, es decir una molécula, la cual se dirige a los receptores y la cual es ligada a un átomo radiactivo. Este tipo de terapias son

cada día más populares pues son capaces de hacer tratamientos localizados a las células malignas sin afectar considerablemente otros tejidos. Las fuentes abiertas que se utilizan en medicina nuclear tienen distintas características como tiempo de vida medio y emisiones β o α y γ; entre las mas utilizadas para tratamiento se encuentran I-131, Y-90 y el Lu-177.

Aunque la parte física de la interacciones radiación-materia es bien entendida, las interacciones de la radiación con la célula y los tejidos y las reacciones biologicas aun esta en exploración. Los estudios en radiobiología hoy en día están dirigidos a diferentes áreas, se siguen haciendo curvas de sobrevida celular para probar nuevos tipos de tratamientos como altas tasa de dosis versus bajas tasas de dosis [Verwijnen, 2004], tasas de dosis contra tiempos de exposición, los mecanismos de reparación celular ante los daños de radiación y cómo la radiosensibilidad depende de éstos o no, mutaciones [Begg, 2010], efecto Bystander, donde efectos biológicos producidos por las radiaciones le ocurren a células que no han sido irradiadas y que se encuentran en cercanía de células irradiadas [XUE], entre otros.

La mayor parte la los efectos de la radiación en las células es descrita para células que han sido irradiadas con haces de aceleradores o de máquinas de rayos X, esto se debe a que este es el método que se utiliza para hacer radioterapias y rayos X que es la

aplicación mas popular de las radiaciones en medicina. También son utilizadas en este tipo de experimentos fuentes cerradas, debido a que son más seguras pues no existe riesgo de contaminación externa o interna, mientras que en el caso de fuentes abiertas siempre existe este riesgo.

Las fuentes abiertas se utilizan en medicina nuclear con dos propósitos: diagnóstico y terapéutico. Los isótopos que se utilizan para hacer imágenes diagnósticas son emisores gamma como el Tc-99m. Este tipo de emisores permite que la radiactividad atraviese al paciente y se detecte por fuera de este, permitiendo formar imágenes estáticas y dinámicas de los órganos o las lesiones con detectores de centelleo.

Las terapias con fuentes abiertas no son las más conocidas y no son la primera opción terapéutica (excepto para cáncer de tiroides) sin embargó cada día es más amplio el espectro en el que se utilizan y por su complejidad requieren cuidados especiales. A diferencia de las imágenes diagnósticas, para tratamiento se requieren isótopos que sean emisores gamma y beta, la partícula beta tiene un rango mucho menor lo que permite que deposite la mayor parte de su energía en la lesión que se desea tratar y la gamma permite determinar en dónde se ubica el radioisótopo dentro del organismo.

A diferencia de la radioterapia convencional, en las terapias con fuentes abiertas no es posible controlar variables como la dosis o la tasa de dosis, esto se debe a que una vez el material radiactivo se encuentra dentro del organismo la forma en la que se distribuye, se capta y elimina es particular para cada organismo, además depende del radioisótopo y la actividad administrada. Por otro lado la terapia dura el tiempo que el material radioactivo esté incorporado y en ningún momento es posible hacer medidas directas de la dosis a la que los órganos de un paciente están sometidos. Por lo que la respuesta de los tejidos a la radiación varía, ya que la tasa de dosis varía con el tiempo y la exposición al material radiactivo es continua durante el tiempo que el tejido expuesto se demore en eliminar la fuente radiactiva o el material decaiga.

Objetivo

Con este proyecto se desea ver el comportamiento de la línea celular A549 irradiada con Lu-177 tras implementar un montaje experimental en el que se puede simular la captación de material radiactivo de un tumor tras una terapia con radionúclidos.

1. Fundamentos Teóricos

La radiobiología es un punto de encuentro entre la biología y la física que se encarga de estudiar la interacción radiación-célula o

tejido. Las interacciones de la radiación con la material son bien conocidas y dependen del tipo de radiación principalmente [SUNTHARALINGA]. La interacción de radiación con células o tejidos es ampliamente conocida, pero siguen existiendo muchos fenómenos que causan interés y por tanto continúan en estudio.

Entender la interacción de la radiación con las células es de gran importancia debido a que las radiaciones son reconocidas principalmente por su capacidad de producir mutaciones, carcinogénesis y muerte celular dependiendo del nivel de exposición y de un manejo adecuado. Sin embargo al mismo tiempo son utilizadas en el día a día en los centros médicos como herramienta para hacer imágenes diagnósticas (rayos X, TAC, Medicina Nuclear) o como tratamiento para cáncer (radioterapia y medicina nuclear).

1.1 Radiaciones Ionizantes

Las radiaciones ionizantes son un fenómeno natural que se definen como la propagación de la energía a través de la materia o el espacio, y que son capaces de producir ionizaciones en la materia. La radiación puede ser generada (Ej. rayos X) o puede presentarse de manera natural en algunos elementos pesados que se conocen como elementos radiactivos. Los elementos radiactivos producen la radiactividad como un proceso físico por el cual los átomos inestables

liberan energía espontáneamente. Existen principalmente tres tipos de radiación: alfa (α), beta (β) o gamma (γ). Un átomo también puede sufrir procesos de captura electrónica (CE) o conversión interna (CI) los cuales resultan en una cascada de electrones, conocidos como electrones Auger [Leo, 1994]. Las características principales de estos tipos de radiación se listan en la tabla 1. La interacción de la radiación con la materia causa ionizaciones y excitaciones en los átomos y las moléculas, estas ionizaciones están relacionadas con la cantidad de energía depositada en la materia. En principio, la interacción radiación-célula y los daños biológicos causados por la radiación depende del tipo de radiación y su energía.

Tipo de Radiación	**Carga**	**Masa (MeV)**
α	+2	3727.33
β^- β^+	-1 +1	0.511
γ	0	0
CI/CE	-1	0.511

Tabla 1: Características de las radiaciones nucleares [Leo, 1994]

Para este proyecto se utilizó Lu-177 debido a sus características. El Lu-177 es emisor de partículas beta de 490 keV y gammas de 113 keV

y 210 keV, tiene un tiempo de vida medio de 6.7 días y actividad específica de 4.1 E 15 Bq/g [NCHPS].

Según los daños causados a las células los tipos de radiaciones pueden dividirse según su transferencia lineal de energía (LET por sus siglas en inglés). Esta cantidad da razón de cuánta energía es depositada localmente en la materia por unidad de longitud, como se muestra en la ecuación (1).

$$LET = \frac{dE}{dx} \quad (1)$$

Donde *dE* es la cantidad de energía depositada en una longitud *dx*, y tiene unidades de energía (kev) por unidad de longitud (μm). Las radiaciones pueden dañar a las células en diferentes partes, pero es de especial interés cuando los daños los sufre el ADN. Entre más ionizaciones ocurran localmente (alto LET) mayor es el daño ocasionado a la célula (Figura 1). Los valores típicos de LET para los radionúclidos más utilizados en terapias para cáncer con fuentes abiertas se encuentran en la tabla 2 [Kassis].

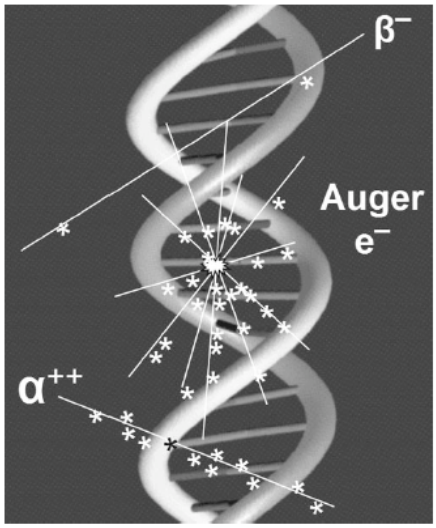

Figura 1: Densidad de ionizaciones (*) que se producen localmente a través de la trayectoria de partículas β, α y electrones Auger. [Kasiss]

Tipo de radiación	Energía	LET
α	5-9 MeV	~80 keV/μm
β	50-2300 keV	~.2 keV/μm
EC/IC	eV-keV	~4-26 keV/μm

Tabla 2 : Características generales de Radionúclidos terapéuticos [Kassis]

1.2 Cálculo de la Dosis

La cantidad más importante en Radioterapia, Radiodiagnóstico, Medicina Nuclear y Radiobiología es la Dosis Absorbida. La dosis absorbida se define como la energía media impartida al medio por unidad de masa en un punto [Attix, 1991], tal como se indica en la ecuación (2).

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (2)$$

Donde *dE* es la energía media impartida por la radiación a una masa *dm* y tiene unidades de Grey (*Gy*). Debido a que no se pueden

hacer medidas directas de las dosis en los pacientes que se someten a terapias con radioisótopos se hace un procedimiento conocido como dosimetría interna. La dosimetría interna consiste en calcular la dosis recibida de diferentes órganos a partir de medidas de retención de actividad en el cuerpo. Estas medidas pueden ser directas en el caso de emisores γ, pues con un detector es posible conocer cómo se encuentra distribuido el material radiactivo, o indirectas en el caso de muestras biológicas como orina, heces o muestras de sangre, que permiten identificar cuánto material está saliendo del organismo. Las medidas directas son las más utilizadas en el ámbito médico y son apropiadas y aplicables a ensayos en cultivos celulares como el aquí propuesto.

En dosimetría interna una región en la que se desea calcular la dosis es conocida como región blanco, una región en donde se acumula material radiactivo es una región fuente para las demás y blanco para si misma. Teniendo en cuenta que la dosis en radiaciones se refiere a la energía absorbida por unidad de masa (ecuación 1), la dosis media absorbida en una región blanco dependerá de:

- El número de desintegraciones que ocurran en la región durante el tiempo de interés, *Ã.* Este valor también se conoce como la actividad acumulada y no es más que la

integral de la actividad inicial con respecto al tiempo, por lo que sus unidades son *desintegraciones*tiempo [#s]*.

- El número medio de partículas ionizantes que son generadas en cada transformación nuclear, *n.*
- La energía media por partícula, *E.*
- La fracción de la energía emitida por la fuente que es absorbida en el blanco, ϕ
- La masa, *m*.

La dosis media absorbida del blanco (B) durante un intervalo de tiempo debida a la radiación de la actividad que se encuentra en la fuente (F), se puede escribir como [ICRU 32, 1979][RADAR] [MIRD 11, 1975]

$$\bar{D}_B = \int_0^{\infty} \dot{D}_B(t)dt = k\frac{\tilde{A}_F \sum n_F E_F \phi_{B,F}}{m_B} \quad \textbf{(3)}$$

Aunque son muchos términos, la mayoría depende del radioisótopo y la masa de la región, de tal forma que esta expresión se puede simplificar como:

$$D = \tilde{A} S \quad \textbf{(4)}$$

Donde S depende del isótopo, la geometría y la masa de la región. Se han desarrollado diferentes simulaciones que utilizan diferentes maniquís o fantomas (Figura 2) para calcular estos valores *S* para diferentes órganos*,* estos resultados se pueden encontrar en la

referencia [MIRD 11] o el software OLINDA, de tal manera que solo es necesario conocer la actividad acumulada en la región en distintos momentos para hacer el cálculo de la dosis [Stabin, 2005] [MIRD 11, 1975]. Los valores S tienen unidades de mGy/MBq*s.

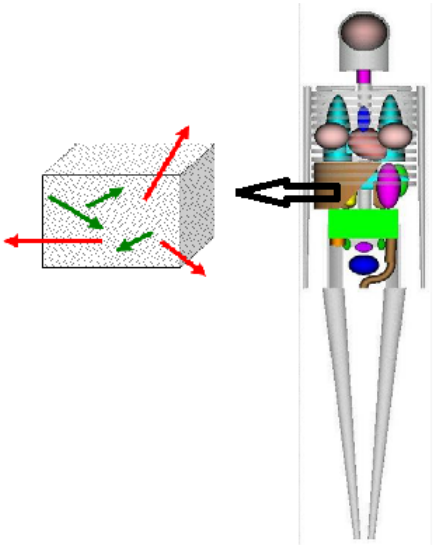

Figura 2: Fantoma utilizado para los cálculos de los valores S en órganos. Cada órgano en el cual se acumula radiación recibe dosis debido a la radiación que contiene y puede irradiar a los órganos vecinos [Radar].

Para los fines de este trabajo los cálculos de esos factores S para los órganos de los maniquís utilizados en las simulaciones ya mencionadas no se pueden aplicar pues la masa que se tiene en un cultivo celular no es comparable con la masa de un órgano.

El valor de $\tilde{A}$ se puede calcular fácilmente teniendo en cuenta que la actividad se puede escribir como:

$$A = A_0 e^{-\frac{\ln 2 t}{\tau}} \quad (5)$$

Donde A_0 es el valor de la actividad inicial, t es el tiempo transcurrido y **τ** es el tiempo de vida media del radioisótopo. La

integral en el tiempo de la actividad, medida en Bequerels, da como resultado el número de desintegraciones que sucedieron por lo que:

$$\tilde{A} = \int_0^{t_f} A_0 e^{-\frac{\ln 2 t}{\tau}} dt = \frac{A_0 \tau}{\ln 2}\left(1 - e^{-\frac{\ln 2 t}{\tau}}\right) \quad (6)$$

donde la integral se hace entre el tiempo 0 y el tiempo transcurrido hasta tomar la medida, t_f.

1.2.1 Dosimetria a nivel de Vóxel.

El hecho de que el material radioactivo no se distribuya uniformemente dentro del cuerpo humano dio como resultado los primeros cálculos de dosimetría interna, pero esto sigue sin ser real pues la actividad dentro de un órgano puede no estar distribuida uniformemente, un órgano puede captar de manera diferente en diferentes partes. Como solución a este problema se está desarrollando la dosimetría a nivel de vóxel. La dosimetría de voxeles se define como el cálculo de la dosis en una región que va desde pocos centímetros hasta micrómetros (Figura 3) [MIRD 17, 1999]. Diferentes cálculos se han hecho para tener los valores S a nivel de vóxel. El grupo de Imágenes Médicas de la Universidad de Boloña, Italia, tienes los resultados de estos cálculos hechos en Montecarlo[1] para diferentes radioisótopos y diferentes dimensiones de vóxel [Pacillio,2009].

[1] El método Montecarlo se refiere a un método estocástico que se emplea como datos de entrada números aleatorios y las probabilidades para solucionar un

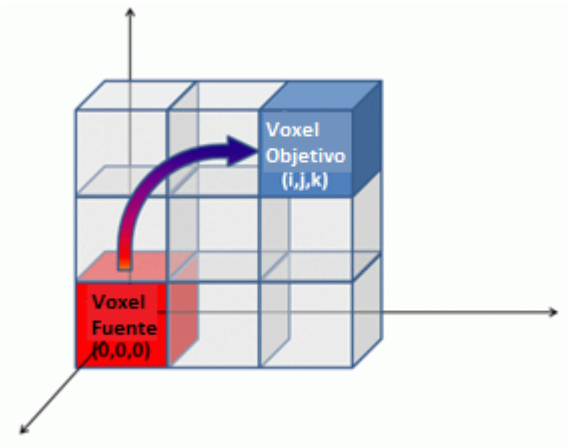

Figura 3: Dosimetría a nivel de vóxel [Pacillio, 2009]

Para efectos del experimento estos valores son de gran importancia pues las cajas en las que se diseñó el experimento están divididas en pozos, (ver capítulo 2) cilíndricos que tiene una capacidad máxima de 400 µl por lo que se aproximó el pozo cilíndrico a un vóxel cúbico de lado correspondiente al volumen utilizado, y se utilizó el valor S calculado por el grupo de Imágenes Médicas de Boloña. De tal manera que la dosis en cada pozo en el montaje se puede calcular según la (ecuación 4), donde el valor S corresponderá al valor de S en un vóxel del tamaño del pozo y será debido solo a el material radiactivo que se encentra dentro de su propio volumen. Los valores S para diferentes volúmenes con el isótopo Lu-177 se listan en la tabla 3.

Volumen (mm^3)	Tamaño del vóxel cúbico (mm)	S (mGy/(MBq s))
110.6	4.8	$1.78E^{-1}$
125	5	$1.58E^{-1}$
216	6	$9.25E^{-2}$
314.4	6.8	$6.41E^{-2}$
799.2	9.28	$2.56E^{-2}$

Tabla 3: Tabla de los valores S para diferentes tamaños de vóxel

1.3 Interacción Radiación-Célula

Las interacciones radiación-célula se dan en tres tiempos como se muestra en la figura 4. El primero cuando la radiación interactúa directamente con los átomos que componen la célula y no toma más de 10^{-10} segundos. En el segundo tiempo estos átomos que quedaron ionizados interactúan y reaccionan químicamente entre sí y con otros componentes celulares, estas reacciones no toman más de 1.5 segundos. Por último se presentan reacciones enzimáticas que actúan sobre el daño químico, de tal manera que la mayoría de los daños producidos son reparados, las lesiones que no son reparadas pueden conducir a la muerte celular (efectos agudos), o a efectos como las fibrosis o la inducción de carcinogénesis que puede aparecer años después [Llorente, 2003].

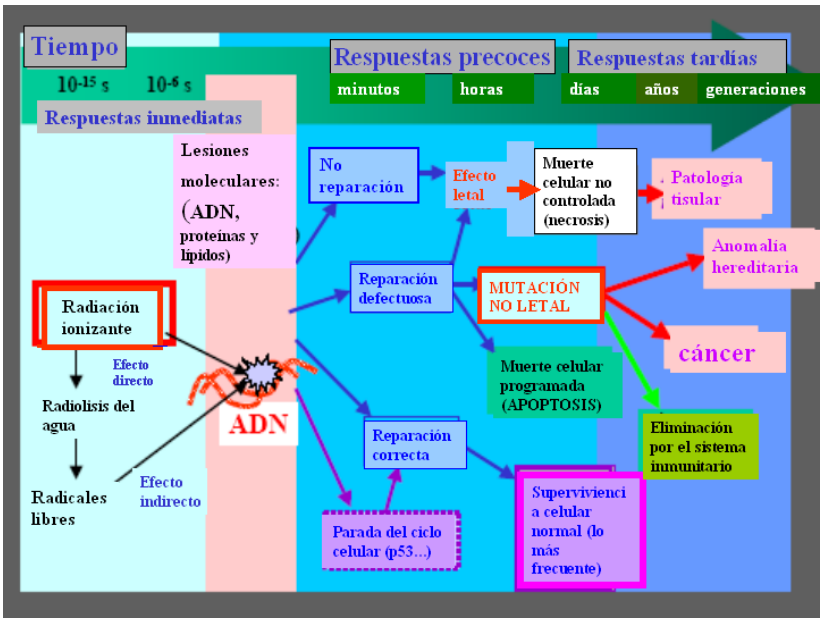

Figura 4: Tiempos en radiobiología, tomada de http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Radiobiolog%C3%ADa1.png

En el primer momento, cuando una molécula experimenta ionizaciones y excitaciones causadas por un elemento radioactivo se vuelve inestable, lo cual la hace reaccionar con el medio que la rodea. En un sistema biológico la molécula que se encuentra con mayor frecuencia es agua (H_2O). Teniendo en cuenta que la célula es una solución acuosa existen dos maneras en que la radiación interactúe con ella: directa o indirecta, como se ve en la figura 5. La interacción directa se da con cualquier molécula de la célula que no sea agua, por lo que la interacción indirecta de la radiación con la célula depende de la interacción de la radiación con las moléculas de agua y sus derivados, lo que se conoce como radiolisis del agua. La radiolisis del agua se puede presentar de dos maneras [Llorente, 2003]:

- Excitación de la molécula de agua: Cuando a causa de la radiación la molécula de agua queda excitada ésta se puede disociar en dos radicales libres, H. y HO. que son altamente reactivos.
- Ionización de la molécula de agua: Cuando la radiación ioniza la molécula de agua dejando un ion H_2O^+y un electrón libre. El ion H_2O^+ es muy inestable y se descompone en el ion H^+ y el radical HO. El electrón libre queda con poca energía y es capturado por moléculas de agua, por lo que en este punto se le conoce como electrón acuoso[2]. El electrón acuoso puede reaccionar con otras moléculas orgánicas o con otra molécula de agua produciendo un radical H. y uno HO..

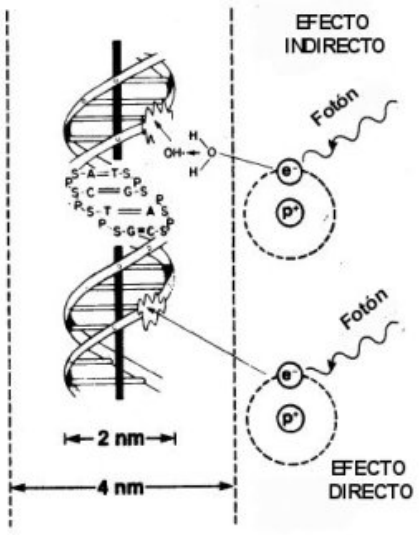

Figura 5: Efectos directos e indirectos de la radiación en la materia [Schower].

[2] Este nombre es utilizado por algunos autores para referirse a el estado de la interacción.

Los iones y radicales que se producen en este proceso dan paso a la etapa química de la interacción puesto que son altamente reactivos lo que hace que se recombinen rápidamente entre ellos o interactúen con otras moléculas en la célula, como el ADN, produciendo daños en la célula y dando paso a la etapa biológica.

El daño que la radiación hace a la célula se puede clasificar como letal o subletal. Los daños letales producen la muerte de la célula mientras que los daños subletales pueden ser reparados o acumulados para finalmente causar muerte celular. El daño que la radiación causa en la célula, ya sea letal o subletal, depende de distintos factores como el tipo de radiación y su energía, el momento del ciclo en el que se encuentre la célula y de las características del medio que la rodea [Llorente, 2003]. El momento del ciclo celular en que se encuentra la célula es importante pues la célula es más radiosensible cuando se encuentran en mitosis (división celular) pues el material del núcleo celular queda expuesto, aunque en un tejido no todas las células se encuentran en el mismo momento del ciclo celular en los cultivos in-vitro es posible coordinar las células pero para este proyecto este método no es utilizado. El medio que rodea la célula es igualmente importante en la respuesta celular debido a que existen agentes radiosensibilizadores, como el oxígeno, al igual que radioprotectores que pueden potenciar o disminuir respectivamente los efectos de los

radicales provenientes de la radiolisis del agua, para este proyecto se utilizaron las condiciones estándar de los cultivos in-vitro.

Generalmente se cuantifica la muerte celular con curvas de supervivencia celular donde se grafica la fracción de células supervivientes después del tratamiento. Para la mayoría de las células la curva de fracción de supervivencia es descrita por una curva que se ajusta a un modelo linear cuadrático en función de la dosis (ecuación 7); La supervivencia células *S* en relación a la dosis *D* se describe como se muestra en la ecuación 1[Llorente, 2003][Verwijnen, 2004].

$$Ln(S) = -\alpha D - \beta D^2 \quad (7)$$

Donde α y β son parámetros que se refieren a diferentes categorías de la lesión celular, α es denominada letal y proviene de la suposición que un sólo evento radiactivo pueda causar un efecto letal, es además un indicativo de la radio-sensibilidad intrínseca de la célula. La parte cuadrática proviene de la suposición de que se necesitan dos eventos subletales en una misma célula para provocar la muerte de ésta. Por otro lado, β es un estimado de la capacidad de la célula de reparar el daño, figura 6. La relación α /β es la dosis en la cual la muerte celular es causada igualmente por daños reparables, como rompimiento de una cadena de ADN, e irreparables, como rompimiento doble de la cadena de ADN, esta constante también es indicadora de la radiosensibilidad celular, entre mayor α /β menor sensibilidad a la radiación. Reproducir estas curvas fue uno de los

primeros trabajos que se hicieron en radiobiología, así como estudiar la radio-resistencia de algunas líneas celulares y algunos materiales que hacen variar las repuestas de las células ante la radiación [Bases, 1959].

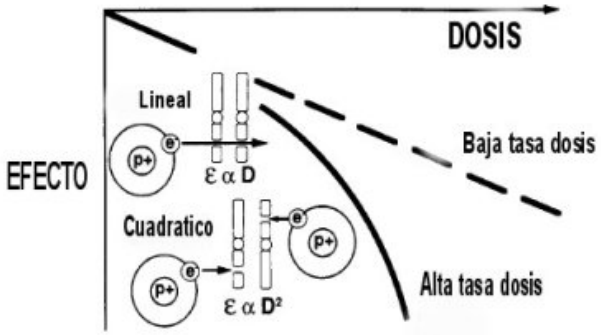

Figura 6: La parte lineal del modelo corresponde a los daños letales a la célula como lo rompimientos dobles de cadena, la parte cuadrática corresponde a los efectos por daños sub-letales [Schorwer].

Cuando la dosis total entregada a las células es fraccionada o prolongada los efectos de reparación celular y la interacción de estos con las radiaciones subsecuentes se altera el segundo término de la (ecuación 7), como solución a esto se ha modificado la ecuación 7 introduciendo un factor (ecuación 8) de corrección que da razón de la cantidad de daño causado por el patrón temporal de la tasa de dosis [Bodey, 2004] [Dale, 1996][McParland, 2010].

$$Ln(S) = -\alpha D - \beta G D^2 \quad (8)$$

donde G se conoce como el factor Lea-Catcheside o factor de dosis prolongada [Bodey, 2004][McParland, 2010] y en su forma generalizada está dado por:

$$G = \frac{2}{D^2}\int_0^T \dot{D}(t)\int_0^t \dot{D}(t')e^{-\mu(t-t')}dt'\,dt \quad (9)$$

Donde T es el tiempo total de tratamiento, t' es un punto en el tiempo que se encuentra entre el primer daño sub-letal y la segunda incidencia de la radiación y μ es la constante de reparación de daños sub-letales, μ tiene unidades de 1/hora y sus valores típicos de están entre 0.5 y 1.4, donde entre menor sea el valor mas rápida es la capacidad de reparación de la célula. En este caso la tasa de dosis decrece exponencialmente, a medida que la actividad decrece, y esta se puede escribir como:

$$\dot{D} = AS \quad \textbf{(10)},$$

para este caso:

$$G = \frac{2}{\lambda - \mu}\left(\frac{\lambda}{1-e^{-\lambda T}}\right)^2\left(\frac{1-e^{-(\lambda+\mu)t}}{\lambda+\mu} - \frac{1-e^{-2\lambda}}{2\lambda}\right) \quad \textbf{(11)},$$

donde λ es la constante de decaimiento del radioisótopo utilizado. Expandiendo las exponenciales a segundo orden se puede ver que $G \to 1$ cuando $T \to 0$ y cuando $T \to \infty$ y $t \to \infty$ G toma el siguiente valor [MacParland].

$$G_{\infty} = \frac{\lambda}{\lambda - \mu} \quad (12)$$

1.4 Línea Celular

Para este experimento se utilizó la línea celular A549 (figura 7) que corresponde histológicamente al grupo de células no pequeñas de cáncer de pulmón (NSCLC por sus siglas en ingles) y al subtipo de carcinoma de pulmón. Fue adquirida a través de la ATCC (American Type Culture Collection). Es un tipo celular adherente, lo que significa que las células se adhieren a la superficie del sistema de cultivo [ATCC]. Las células tiene un tiempo de duplicación de aproximadamente 24 horas. Se escogió trabajar con este tipo de células por dos razones, la primera es por conveniencia pues se contaba con este tipo de células, crecen rápidamente y pueden crecer sin tantos cuidados. Por otro lado existen diferentes estudios en radiobiología para los que estas células han sido utilizadas. La línea A549 reporta ser de una menor radiosensibilidad que otras líneas celulares con la misma clasificación histológica [Carmichael, 1989]. En la figura 8 se tiene la curva de fracción de supervivencia vs dosis para esta línea celular irradiada con un haz de fotones de 6 MeV a una tasa de dosis de 2 Gy/min. La fracción de supervivencia para una dosis de 2 Gy es de 0.82.

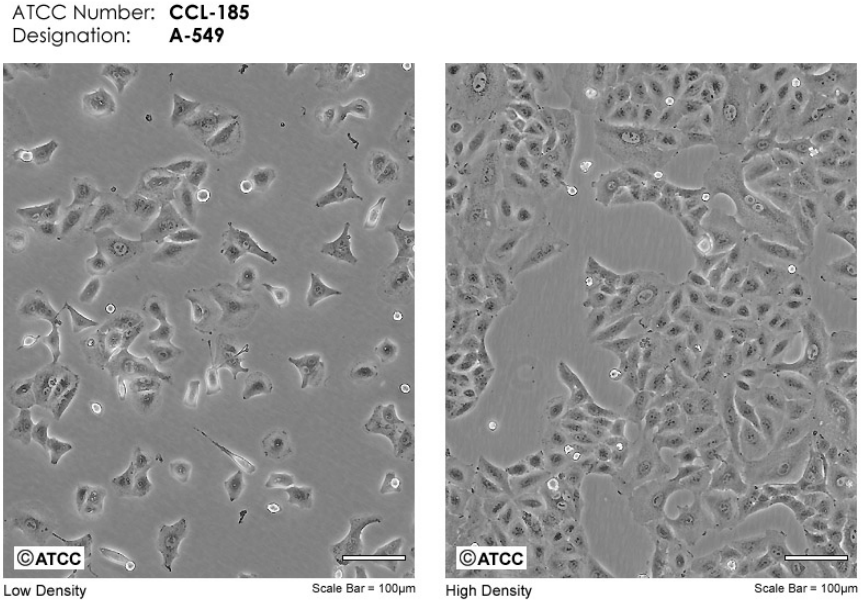

Figura 7: Línea celular A 549 fotos tomadas por la ATCC [ATCC].

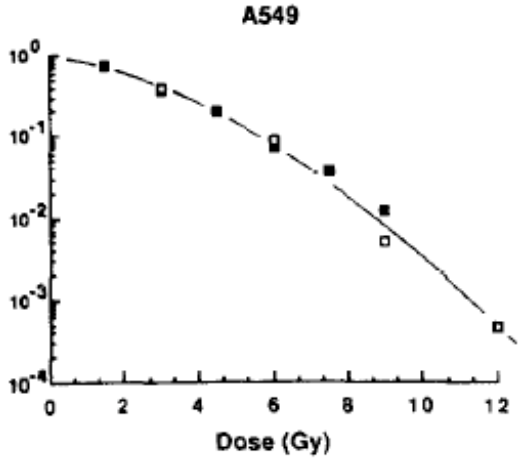

Figura 8: Curva de fracción de supervivencia para la línea celular A549, diferentes símbolos indican diferentes experimentos [Carmichael, 1989].

De esta gráfica se pueden deducir los valores de las constantes que ajustan esta curva al modelo linear cuadrático. Para este caso los

valores correspondientes son α=18 Gy^{-1} y β=370 Gy^{-2} por lo que la constante α/β=0,0486Gy [Carmichael, 1989]. La línea celular A549 ha sido reportada como una de las líneas mas resistentes a diferentes tipos de tratamientos [Liebmann, 2006], por lo que podemos suponer que la velocidad de reparación celular de esta línea es muy alta.

2. Montaje experimental

El montaje experimental en radiobiología por lo general consiste de tres partes principales y varía según la finalidad del experimento. Las tres partes principales son: el modelo biológico, en este caso un cultivo celular, la irradiación, y la forma en la que se miden los efectos de la radiación. El cultivo celular debe estar estandarizado y en él han de estar manejados todos los cuidados dependientes del tipo de células que se utilizan. La forma de irradiar las células varía según los recursos y la finalidad del experimento. Las medidas de los efectos de la radiación sobre las células pueden ser muy variadas, desde muerte celular hasta la determinación de mecanismos de reacción enzimático o seguimiento de los cambios a nivel de expresión génica de la célula cuando se irradia. Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Farmacogenética del Cáncer, del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.