

*Estudio del Efecto “Bystander” en
células clonogénicas bajo la presencia
de FDG*

Br. Nathaly E. Lajo Fonseca

Tutor: Dr. Rafael Martín Landrove

Trabajo Especial de Grado



Caracas, 27 de julio de 2011

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE FÍSICA



ESTUDIO DEL EFECTO “BYSTANDER” EN CÉLULAS CLONOGÉNICAS BAJO LA PRESENCIA DE FDG

Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Por la Br. Nathaly Lajo Fonseca

Para optar al título de Licenciada en Física.

Caracas, 27 de julio de 2011.

A Dios.

A mi mamá y a mi nanita.

A Piero.

A la memoria de quienes ya no están: mi papá, mi abuela Estela, mi tío Víctor y mi tía May, inmensamente agradecida por haberlos tenido en mi vida y lamento que hoy no estén físicamente para compartir conmigo este momento. Los extraño.

A mis tíos y primos.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Rafael Martín, por su excelente guía y admirable paciencia. Por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo. ¡Muchas gracias!

A las profesoras del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Universidad Central de Venezuela: Dra. Elizabeth Merentes y Dra. Lorena Márquez, por ayudarme y guiarme en un campo completamente desconocido para mí con muchísima paciencia: el de los cultivos celulares. Igualmente a las tesoristas del laboratorio: Emily y Bélgica quienes también me colaboraron y aclararon dudas.

A los químicos de la unidad del ciclotrón del Centro Diagnóstico Docente Las Mercedes (CDD): Indira Lugo, Neydher Berroterán, Ana Romero y Eloy Zancudo, por su paciencia y excelente disposición en la realización de este trabajo.

Al Dr. Peter Taylor del Laboratorio de Patología Celular y Molecular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), quien amablemente me proporcionó las líneas celulares.

A Sandra Duque, del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química, por su cordialidad y gentileza al facilitar la lectura de las placas en el espectrofotómetro del laboratorio.

A mis amigos, quienes me acompañaron a lo largo de la carrera, me apoyaron en todo momento y gracias a quienes se me hicieron más llevaderos momentos difíciles: Joyce Sayago y María Yépez (creo que nunca les agradecí por su apoyo, lo valoro mucho y no lo olvido, fueron días grises y estuvieron siempre ahí); Héctor Mendoza, Berekyakaleb Errico, Tahiris Márquez, Osiris Barrios, Iskya García, Miguel Yáñez, Richard Caraballo, David Rondón, Omar Barrios, Johnny Salas, Jesús Cabriles, Bárbara Yáñez, Omar León, Grecia Gómez, José Rosario, David Da Costa. Así como a los que conocí en cursos y materias de la orientación: Rita Castillo, Alejandro Rincónes, Katiuska Coello y Alfredo Parra.

A los profesores Pierre Embaid y David Verrilli, no olvido sus consideraciones en un semestre que fue terrible para mí.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	I
Índice de Figuras	VIII
Índice de Tablas	XVI
1. Introducción	1
2. Objetivos	4
2.1. Objetivo General	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. Principios Físicos	5
3.1. Clasificación de la Radiación	5
3.2. Decaimiento de Partículas Beta	7
3.2.1. Decaimiento β^-	7
3.2.2. Decaimiento β^+	7
3.3. Interacción de Partículas Beta con la Materia.	8
3.3.1. Excitación	10
3.3.2. Ionización	10
3.4. Producción de Radionúclidos	11

3.4.1. El Ciclotrón	12
3.4.2. Descripción del Proceso Químico de Síntesis de FDG.	14
3.5. Dosis en los Cultivos	18
4. Radiobiología	22
4.1. Células	22
4.1.1. Células Madre	22
4.1.2. Células Clonogénicas	22
4.2. Ensayos Clonogénicos	23
4.3. Curvas de Supervivencia	25
4.4. Muerte Celular	26
4.4.1. Autofagia	27
4.4.2. Necrosis	28
4.4.3. Apoptosis	28
4.5. Efecto Bystander	29
5. Metodología Experimental	33
5.1. Cálculo de Dosis	33
5.1.1. Fase de Prueba	35
5.1.2. Primera Fase	36
Línea 3T3	36
Línea HT-29	37
5.1.3. Segunda Fase	38
5.2. Procedimiento	40
5.2.1. Fase de Prueba	40
5.2.2. Primera Fase	52
5.2.3. Segunda Fase	65

5.2.4. FDG Decaído	74
6. Resultados y Discusiones	79
6.1. Fase de Prueba	79
6.1.1. Placa Completa	85
6.1.2. Placa Incompleta	90
6.2. Primera Fase	95
6.2.1. Línea 3T3	96
Placas Irradiadas	96
Placas con Medio traspasado	100
6.2.2. Línea HT-29	104
Placas Irradiadas	104
Placas con Medio Traspasado	109
6.3. Segunda Fase	113
6.3.1. Irradiadas	114
6.3.2. Medio Traspasado	121
6.4. Glucosa	128
7. Conclusiones	132
8. Recomendaciones	134
Apéndices	136
A. Materiales y Equipos	137
A.1. Línea Celular 3T3	137
A.2. Línea Celular HT-29	138
A.3. Frascos de Cultivo	139

ÍNDICE GENERAL

A.4. Incubadora PRECISION Scientific Economy 5EG	139
A.5. Incubadora de CO ₂	141
A.6. Pipetas Graduadas	142
A.7. Placas de Cultivo	143
A.7.1. Placas de cultivo de 6x4 pozos Nunclon TM Δ Surface.	143
A.7.2. Placas de cultivo de 12x8 pozos CELLSTAR® Greiner Bio-One	144
A.8. Vasos de Precipitado	146
A.9. Gasa	146
A.9.1. Gasa Hidrófila	146
A.9.2. Gasa Esterilizada	146
A.10. Tubos de Centrífuga	147
A.11. Camisas en Acero Inoxidable	147
A.12. Envases de descarte	147
A.13. Parafilm	148
A.14. Campana de flujo laminar	148
A.15. Medios Nutritivos y Suplementos	151
A.15.1. Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute).	151
A.15.2. Medio nutritivo DMEM (Dulbelcco's Modified Eagle Medium).	152
A.16. Etanol al 70 %	152
A.17. Azul de tripano	152
A.18. Phosphate buffered saline (PBS)	153
A.19. Enzima Tripsina EDTA	153
A.20. MTT y DMSO	153
A.21. Cámara de Neubauer	154
A.22. Microscopio invertido	155
A.23. Micropipetas de volumen variable	155

ÍNDICE GENERAL

A.24.Puntas	156
A.25.Pipeteador automático	157
A.26.Piceta	158
A.27.Baño termostatzado de agua (Baño María)	158
A.28.Centrífuga	159
A.29.Viales	159
A.30.Inyectoras	160
A.30.1.Balanzas	160
A.31.Espectrofotómetro	161
A.32.Actímetro	162
A.33.Dosímetro Personal	164
A.34.Sistema MINItace GE	164
B. Preparación de Medio Nutritivo	165
B.1. DMEM	165
B.1.1. Para 1L DMEM (medio base)	165
B.1.2. Para 100 mL	165
C. Cálculos Primera Fase	166
C.1. Línea 3T3	166
C.2. Línea HT-29	167
D. Cálculos Segunda Fase	170
Referencias	171

ÍNDICE DE FIGURAS

3.1. Clasificación de la radiación.	6
3.2. Emisión Positrón	7
3.3. Reacción de Aniquilación	8
3.4. Excitación y Desexcitación	10
3.5. Ionización	11
3.6. Ciclotrón	12
3.7. Unidad de Control de Vacío	13
3.8. Esquema general de los electrodos de un ciclotrón.	13
3.9. Molécula de FDG	14
3.10. Esquema del Proceso Químico a través del cual se sintetiza el FDG. . .	15
3.11. Módulo Sintetizador TRACERlab MX_{FDG}	16
4.1. Típica curva de supervivencia celular para células irradiadas en cul- tivos de tejidos, (a) graficada en escala lineal; (b) la misma gráfica en escala logarítmica.	26
4.2. Vista esquemática del proceso de autofagia.	27
4.3. Mecanismos de muerte celular: a la izquierda la necrosis y a la derecha la apoptosis.	29
4.4. Esquema del Experimento con microhaces.	30

ÍNDICE DE FIGURAS

4.5. Transferencia de señales celulares.	31
4.6. Resultados del experimento con microhaces	31
4.7. Representación esquemática del efecto “Bystander” a través del traspaso de medios de cultivo.	32
5.1. Imagen donde se aprecian los elementos de la hoja de trabajo empleada en el CDD	34
5.2. Esquema	41
5.3. Parte de los materiales empleados, antes de ingresarlos a la campana de flujo laminar, IBE.	42
5.4. En la imagen de la izquierda la balanza de dos platos, y en la imagen de la derecha el gotero con el que se equilibra el peso de los tubos de ensayo, IBE.	43
5.5. Forma correcta de ubicar tubos dentro de la centrífuga, IBE.	44
5.6. (A) Suspensión celular en el tubo de centrifugado (antes de centrifugar). (B) Taco celular en el fondo del tubo de centrifuga (después de centrifugar).	44
5.7. Coloración para el conteo celular, IBE.	45
5.8. Cava usada para transportar las placas durante los experimentos.	48
5.9. Esquema de distribución de dosis de la fase de prueba	49
5.10. Elementos con los que se realizó el proceso de coloración, IBE.	51
5.11. Distribución de siembra de placas en la primera fase según línea celular, densidad de siembra y objetivo final.	52
5.12. Esquema de trabajo en la segunda fase.	53
5.13. Fondo de los tubos de centrífuga donde se aprecia el taco celular, IBE.	55
5.14. Primera Fase a densidad de 20.000 células/pozo	58

ÍNDICE DE FIGURAS

5.15. Primera Fase a densidad de 30.000 células/pozo	58
5.16. Reporte del Activímetro para la administración de bajas dosis.	60
5.17. Reporte del Activímetro para entregar las altas dosis.	60
5.18. Línea 3T3 Irradiada a Bajas Dosis en la Primera fase.	61
5.19. Línea HT-29 Irradiada a Bajas Dosis en la Primera Fase.	61
5.20. Línea 3T3 Irradiada a dosis Media-Altas.	62
5.21. Línea HT-29 Irradiada a dosis Media-Altas.	62
5.22. Esquema de Traspaso de Medio en la línea 3T3	63
5.23. Esquema de Traspaso de Medio en la línea HT-29	63
5.24. Pesado de MTT en la balanza, IBE.	64
5.25. Esquema del procedimiento seguido en la segunda fase	66
5.26. Esquema de Siembra para la Segunda Fase	67
5.27. Reportes generados por el activímetro para la segunda fase	70
5.28. Placas de dosificación media-alta. Segunda Fase.	71
5.29. Placa de bajas dosis. Segunda fase.	72
5.30. Esquema de volúmenes traspassados en la segunda fase.	73
5.31. Las ocho placas de HT-29 empleadas en la segunda fase, sembradas a densidad de 3.000 células/pozo y 20.000 células/pozo a la izquierda y derecha respectivamente; ambos grupos con el MTT aplicado, IBE. . .	74
5.32. Dosificación del FDG decaído, IBE.	77
5.33. Dosificación del FDG decaído	78
6.1. Registro inicial de la línea 3T3 (4x), antes de trasladarlas para su irra- diación.	80

6.2. Primeras tres columnas observadas al microscopio invertido(4x) en ambas placas de la fase de prueba. Registro tomado cuatro horas después de la irradiación	81
6.3. Últimas tres columnas observadas al microscopio invertido(4x) en ambas placas de la fase de prueba. Registro tomado cuatro horas después de la irradiación	82
6.4. Periferia Incompleta columna 6 (4,1 Gy), 4x	83
6.5. Imágenes tomadas antes de hacer la fijación de las placas en la irradiada a columnas intercaladas, con un aumento de 10x	84
6.6. Imágenes correspondientes a la primera columna (Dosis de 1,41 Gy) en la placa completamente irradiada observadas al microscopio invertido(40x).	85
6.7. Imágenes correspondientes a la segunda columna (Dosis de 1,93 Gy) en la placa completamente irradiada observadas al microscopio invertido(40x).	86
6.8. Imágenes correspondientes a la tercera columna (Dosis de 2,43 Gy) en la placa completamente irradiada observadas al microscopio invertido(40x).	87
6.9. Imágenes correspondientes a la cuarta columna (Dosis de 2,89 Gy) en la placa completamente irradiada observadas al microscopio invertido(40x).	88
6.10. Imágenes correspondientes a la quinta columna (Dosis de 3,33 Gy) en la placa completamente irradiada observadas al microscopio invertido(40x).	89

ÍNDICE DE FIGURAS

6.11. Imágenes correspondientes a la sexta columna (Dosis de 3,73 Gy) en la placa completamente irradiada observadas al microscopio invertido(40x).	90
6.12. Imágenes correspondientes a la primera columna (Dosis de 0 Gy) en la placa irradiada a intercolumnas observadas al microscopio invertido(40x).	91
6.13. Imágenes correspondientes a la segunda columna (Dosis de 1,93 Gy) en la placa irradiada a intercolumnas observadas al microscopio invertido(40x).	92
6.14. Imágenes correspondientes a la tercera columna (Dosis de 0 Gy) en la placa irradiada a intercolumnas observadas al microscopio invertido(40x).	92
6.15. Imágenes correspondientes a la cuarta columna (Dosis de 2,89 Gy) en la placa irradiada a intercolumnas observadas al microscopio invertido(40x).	93
6.16. Imágenes correspondientes a la quinta columna (Dosis de 0 Gy) en la placa irradiada a intercolumnas observadas al microscopio invertido(40x).	93
6.17. Imágenes correspondientes a la sexta columna (Dosis de 3,73 Gy) en la placa irradiada a intercolumnas observadas al microscopio invertido(40x).	94
6.18. Registro de las líneas antes de irradiarlas (4x).	95
6.19. Imágenes correspondientes la placa de la línea 3T3 irradiada a bajas dosis observadas al microscopio invertido(4x).	96
6.20. Imágenes correspondientes la placa de la línea 3T3 irradiada a dosis media-altas observadas al microscopio invertido(4x).	97

ÍNDICE DE FIGURAS

6.21. Supervivencia Celular de la línea 3T3 Irradiadas	99
6.22. Registro de la línea 3T3 con medio traspasado a bajas dosis (4x).	100
6.23. Registro de la línea 3T3 con medio traspasado a dosis media-altas (4x).	101
6.24. Supervivencia Celular de la línea 3T3 con medio traspasado	103
6.25. Imágenes correspondientes la placa de la línea HT-29 irradiada a bajas dosis observadas al microscopio invertido(4x).	104
6.26. Imágenes correspondientes la placa de la línea HT-29 irradiada a dosis media-altas observadas al microscopio invertido(4x).	105
6.27. Supervivencia Celular de la línea HT-29 Irradiadas	108
6.28. Registro de la línea HT-29 con medio traspasado a bajas dosis (4x).	109
6.29. Registro de la línea HT-29 con medio traspasado a dosis media-altas (4x).	110
6.30. Supervivencia Celular de la línea HT-29 con medio traspasado	112
6.31. Registro inicial de la línea HT-29, antes de trasladarlas para su irradiación (10x).	113
6.32. Registro de la línea HT-29, tomado después de la irradiación a dosis de 11,22 Gy(10x).	114
6.33. Registro de la línea HT-29, tomado después de la irradiación (4x).	115
6.34. Registro de la línea HT-29, tomado después de la irradiación a dosis de 18,60 Gy(10x).	115
6.35. Registro de la línea HT-29, tomado después de la irradiación a dosis de 20,23 Gy(10x).	116
6.36. Supervivencia Celular de la línea HT-29 Irradiadas	120
6.37. Imágenes correspondientes a algunos daños observados en las placas con medio traspasado (10x).	121
6.38. Imágenes correspondientes a algunos daños observados en las placas con medio traspasado (10x) (continuación 2).	122

6.39. Imágenes correspondientes a algunos daños observados en las placas con medio traspasado (10x) (continuación 3).	123
6.40. Supervivencia Celular de la línea HT-29 con medio traspasado (Segunda Fase).	127
6.41. Supervivencia Celular de la línea HT-29 sometida a FDG decaído.	130
A.1. Células fusiformes 3T3, 4x	137
A.2. Células epiteliales de la línea celular HT-29 donde se puede observar el crecimiento en colonias, 4x.	138
A.3. Frascos de Cultivo de 25 cm ²	139
A.4. Incubadora PRECISION, CDD.	140
A.5. Incubadora NUAIRE, IBE.	142
A.6. Pipeta	142
A.7. Placas Nunclon TM Δ Surface	144
A.8. Imagen referencial de las placas CELLSTAR® greiner Bio-One de 96 pozos.	145
A.9. Imagen referencial de vasos de precipitado o beakers.	146
A.10. Tubo de Centrífuga con su tapa.	147
A.11. Camisas	147
A.12. Envase de descarte.	148
A.13. Parafilm	148
A.14. Área de Trabajo: campana de flujo laminar, a la derecha bandeja de descarte y algunos materiales antes de ser ingresados a la campana. IBE.	149

A.15. Campana de Flujo laminar instalada en el CDD, dentro de la cabina está una L plomada, termómetro digital, brazo mecánico, recipiente para desechos; y debajo están los viales, inyectadoras y demás implementos estériles necesarios para la dosificación.	150
A.16. Cámara de Neubauer, IBE.	154
A.18. Imagen explicativa de los componentes de las micropipetas Eppendorf® Series 2000.	156
A.19. Puntas de Micropipeta.	157
A.20. Pipeteador Automático Disponible en el IBE	157
A.21. Piceta.	158
A.22. Baño Termostático, IBE.	159
A.23. Balanzas empleadas en los experimentos, IBE.	160
A.24. Espectrofotómetros que se utilizaron en el presente trabajo.	162
A.25. Diseño Activímetro	163
A.26. Activímetro ubicado en el CDD	163
A.27. Dosímetro, IBE.	164

ÍNDICE DE TABLAS

5.1. Datos Fase de prueba	35
5.2. Cálculo de Dosis en la Fase de Prueba	35
5.3. Datos Primera Fase de la línea 3T3	36
5.4. Cálculo de Dosis en la Primera fase para la línea 3T3	36
5.5. Datos Primera Fase de la línea HT-29	37
5.6. Cálculo de Dosis en la Primera fase para la línea HT-29	37
5.7. Datos para la segunda fase a bajas dosis de la línea HT-29	38
5.8. Cálculo de Dosis (bajas) en la Primera fase para la línea HT-29	38
5.9. Datos para la segunda fase a dosis media-altas de la línea HT-29	38
5.10. Cálculo de Dosis (media-altas) en la segunda fase para la línea HT-29	39
6.1. Valores de exposición durante la fase de prueba	79
6.2. Valores de exposición durante la primera fase.	96
6.3. Absorbancia de la línea 3T3 irradiadas.	98
6.4. Absorbancia de la línea 3T3 con medio traspasado.	102
6.5. Absorbancia de la línea HT-29 irradiadas (Primera Fase).	106
6.6. Absorbancia de la línea HT-29 con medio traspasado (Primera Fase).	111
6.7. Valores de exposición durante la primera fase.	113

6.8. Absorbancia de los controles para la línea HT-29 irradiadas (Segunda Fase).	117
6.9. Resultado promediado de las columnas de control en la línea HT-29 irradiadas (Segunda Fase).	117
6.10. Absorbancia de la línea HT-29 Irradiadas (Segunda Fase).	118
6.10. Absorbancia de la línea HT-29 Irradiadas (Segunda Fase).	119
6.11. Absorbancia de los controles para la línea HT-29 con medio traspasado (Segunda Fase).	124
6.12. Resultado promediado de las columnas de control en la línea HT-29 con Medio Traspasado.	124
6.13. Absorbancia de la línea HT-29 con medio traspasado (Segunda Fase).	125
6.13. Absorbancia de la línea HT-29 con medio traspasado (Segunda Fase).	126
6.14. Resultados de las columnas de control en la línea HT-29 con FDG decaído.	128
6.15. Resultado promediado de las columnas de control en la línea HT-29 con FDG decaído.	128
6.16. Absorbancia de la línea HT-29 sometida a FDG decaído.	129
A.1. Especificaciones de la Incubadora PRECISION Scientific Economy 5EG.	140
A.2. Especificaciones de las placas Nunclon TM Δ Surface, según el fabricante.	143
A.3. Especificaciones de las placas CELLSTAR® greiner Bio-One de 96 pozos, según el fabricante.	145
A.4. Especificaciones del RPMI, SIGMA.	151
A.5. Especificaciones del DMEM, SIGMA.	152

Resumen

El Efecto “Bystander” es el fenómeno a través del cual células que no han sido expuestas a radiación ionizante evidencian signos de irradiación al estar en la vecindad de células irradiadas. Se habla de dos grupos en este efecto, uno es por medio traspasado, que es el empleado en este trabajo y el otro por impacto con partículas de microhaces.

Se seleccionaron dos líneas celulares: una normal y una transformada, en este caso se trabajó con la línea 3T3 como línea normal, que pertenece a fibroblastos de ratón; y con la línea HT-29, correspondiente a adenocarcinoma de colon. Ambas fueron elegidas principalmente por su corto tiempo de duplicación.

Para la realización de este trabajo se hizo necesario el diseño e implementación de un protocolo adecuado que permitiera evaluar los daños causados por las dosis entregadas a los cultivos celulares, algunos de los elementos considerados son: la densidad de siembra, el volumen de medio de cultivo, los días consecutivos para evaluar la respuesta y las dosis de interés.

Se logró comprobar la presencia del efecto “Bystander”, partiendo de que tanto la radiación ionizante como el FDG decaído ocasionan disminución de la población celular, se puede decir que las células irradiadas están segregando alguna sustancia al medio que les indica a las otras células presentes la necesidad de recuperarse de los daños ocasionados por estos dos elementos, de esta manera se observa un aumento en la fracción de supervivencia tanto en las células irradiadas como en las de medio traspasado.

INTRODUCCIÓN

El efecto Bystander es el fenómeno en el cual células que no han sido sometidas a radiación ionizante exhiben efectos de exposición como resultado de señales recibidas de células vecinas irradiadas. Este efecto viene siendo estudiado desde hace más de una década [17], [16].

Se tiene que en células epiteliales el efecto puede evidenciarse en tiempos cortos como en los 30 minutos posteriores a la irradiación e inclusive transcurridas 60 horas después de ella. Se ha identificado un umbral a partir del cual empieza a mostrarse, siendo este 0,25 mGy y al aumentar la dosis hasta 10 Gy no se aprecian cambios importantes en el efecto.

Buscando analizar más detalladamente este efecto algunos científicos diseñaron un experimento empleando microhaces sobre cultivos celulares [6], para ello tomaron dos poblaciones celulares y tiñeron una de naranja y la otra de azul, luego las mezclaron para formar un solo cultivo. Posteriormente programaron un acelerador de manera que fuese capaz de lanzar diez partículas alfa sobre el centroide de las células azules, y 48 horas después una fracción de las células no irradiadas presentaron puentes cromosomales y micronúcleos. La evidencia que se tiene hasta los momentos parece indicar que el mecanismo predominante para la muerte celular

es la apoptosis, ya que transcurridas 48 horas luego de recibir el medio irradiado los estudios referencian gran cantidad de cuerpos apoptóticos así como diversas transformaciones malignas a nivel celular en células no irradiadas.

Todo esto hace pensar que es imposible considerar a la célula como un funcional aislado, ya que la evidencia demuestra que existe un mecanismo a través del cual hay una comunicación intercelular. El efecto sugiere que las células irradiadas segregan una sustancia que pasa al medio de cultivo. Esta sustancia parece tener la capacidad de producir muerte celular cuando con el medio de cultivo es transferida a células de un cultivo no irradiado y curiosamente si se irradia el medio de cultivo en ausencia de células no hay efecto.

Por otra parte, tenemos que el efecto no necesariamente induce caída en la población celular presente sino que por el contrario, también evidencias recientes [2] indican que puede estimular el crecimiento celular, de esta manera se vuelve aún mas complejo e importante de considerar para tratamientos derivados de la radiación ionizante.

La Fluodeoxiglucosa (FDG) es un radiofármaco que se utiliza en imagenología médica en la modalidad de tomografía con emisión de positrones (PET). Químicamente es un análogo a la glucosa con un isótopo radiactivo, el ^{18}F . Este isótopo posee características que lo hacen útil, entre estas: su vida media de 110 min, decae en forma de positrones, la energía de emisión de positrones: 635keV, la energía de emisión de fotones: 511 keV, que se produce al aniquilarse el positrón con el electrón.

La propuesta para realizar este trabajo consistió en emplear otra forma de radiación: los positrones emitidos en el decaimiento del ^{18}F presente en el FDG, en-

tregando diferentes dosis a cultivos celulares, específicamente de las líneas HT-29 (Adenocarcinoma de colon) y 3T3 (fibroblastos de ratón) para posteriormente traspasar el medio de cultivo a otros cultivos no irradiados.

Los resultados se obtuvieron cualitativa y cuantitativamente, los primeros a través de fotografías tomadas a los cultivos celulares y los segundos mediante el ensayo de MTT que consiste en agregar dicho reactivo a los cultivos de manera tal que al reaccionar y hacer el procedimiento correspondiente se leyeron las placas de los cultivos en un espectrofotómetro que permitió obtener los valores de la absorbancia, cantidad proporcional a las células que sobrevivieron, logrando así observar el comportamiento de las poblaciones celulares empleadas en función de la dosis entregada.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Evaluar a través del microscopio óptico el efecto “Bystander” en cultivos de células clonogénicas (normales y transformadas) bajo la acción de radiación ionizante en la forma de positrones emitidos en la desintegración β del ^{18}F presente en azúcares incorporados al medio de cultivo mediante el FDG.

2.2. Objetivos Específicos

- Emplear las curvas de supervivencia para evaluar los efectos de la radiación en cultivos clonogénicos normales y así predecir la respuesta en tejidos normales.
- Emplear las curvas de supervivencia para evaluar los efectos de la radiación en cultivos clonogénicos transformados y así predecir la respuesta en tejidos tumorales.

PRINCIPIOS FÍSICOS

3.1. Clasificación de la Radiación

La radiación se clasifica en dos categorías principales: ionizante y no ionizante, dependiendo de su capacidad para ionizar materia. En la Figura 3.1 se esquematiza esta clasificación.

- **Radiación no ionizante:** no puede ionizar la materia ya que su energía es menor que el potencial de ionización de la materia (considerando que el potencial de ionización es la energía mínima para ionizar un átomo).
- **Radiación ionizante:** puede ionizar la materia directa o indirectamente ya que su energía excede el potencial de ionización de la materia. A su vez contiene dos categorías principales:
 - ***Radiación directamente ionizante:*** partículas cargadas (electrones, protones, partículas alfa, iones pesados).

La radiación directamente ionizante deposita energía en el medio a través de interacciones de Coulomb directas entre la partícula cargada directamente ionizante y los orbitales electrónicos de los átomos en el me-

dio.

Este es el caso de particular interés en el desarrollo de este trabajo ya que se emplearon positrones.

- **Radiación indirectamente ionizante:** partículas neutras (fotones: rayos x, rayos gamma; neutrones). La radiación indirectamente ionizante deposita energía en el medio a través de un proceso de dos pasos:
 - a) En el primer paso una partícula cargada es liberada en el medio (los fotones liberan electrones o positrones, los neutrones liberan protones o iones más pesados).
 - b) En el segundo paso, las partículas cargadas liberadas depositan energía al medio a través de interacciones Coulombianas directas con los electrones orbitales de los átomos en el medio.



Figura 3.1: Clasificación de la radiación.

3.2. Decaimiento de Partículas Beta

3.2.1. Decaimiento β^-

Un núcleo con exceso de neutrones puede alcanzar su estabilidad mediante un proceso que supone la conversión de un neutrón en un protón y un electrón. El protón permanece en el núcleo, pero el electrón es emitido y se conoce como radiación beta.

3.2.2. Decaimiento β^+

Un núcleo inestable que posee exceso de protones, decae.

Un protón puede convertirse en un neutrón y un positrón, que básicamente es un electrón con carga positiva. En este decaimiento, es emitido también un neutrino.

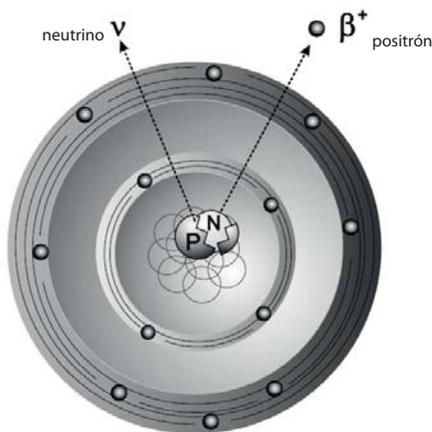


Figura 3.2: Emisión Positrón

3.3. INTERACCIÓN DE PARTÍCULAS BETA CON LA MATERIA. 3. PRINCIPIOS FÍSICOS

El positrón sobrevive por muy corto tiempo, ya que rápidamente encuentra un electrón y ambos son aniquilados.

Durante la reacción de aniquilación, la masa combinada del positrón y el electrón se convierte en dos fotones de energía equivalente a la masa destruida. En la Figura 3.3, se aprecia la reacción.

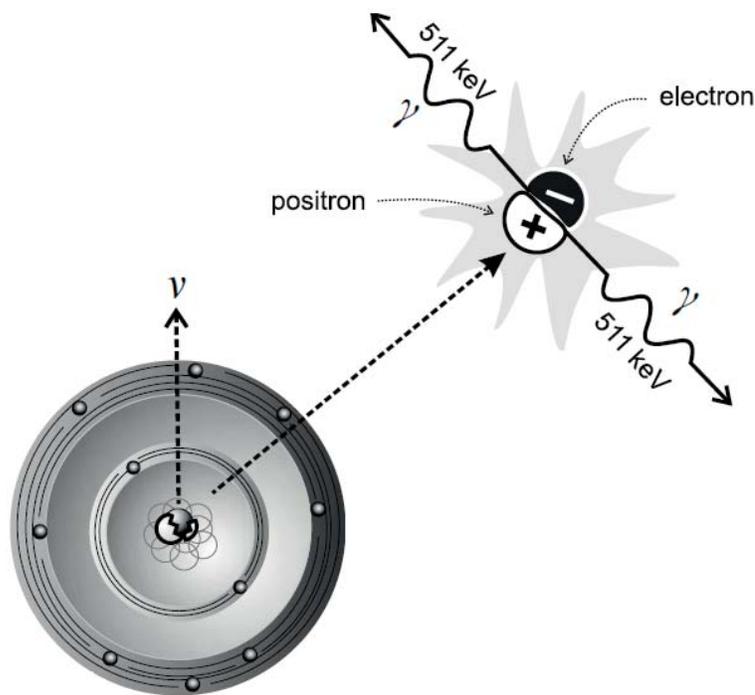


Figura 3.3: *Reacción de Aniquilación*

3.3. Interacción de Partículas Beta con la Materia.

Las partículas cargadas son fundamentales cuando se trata del uso clínico de la radiación, aun cuando la radiación primaria es el haz de fotones, son las partí-

3.3. INTERACCIÓN DE PARTÍCULAS BETA CON LA MATERIA. 3. PRINCIPIOS FÍSICOS

culas cargadas, conocidas como radiación secundaria en tales casos, que causan el efecto biológico, ya sea la muerte celular u otros cambios que pueden inducir eventualmente cáncer. En este trabajo haremos énfasis en los positrones (Partículas β^+).

Una partícula cargada está rodeada por su campo de fuerza eléctrica de Coulomb que interactúa con electrones orbitales (pérdidas de colisión) y el núcleo (pérdidas radiativas) de todos los átomos que se encuentran a su paso a medida que penetra en la materia. La energía transferida de la partícula cargada a la materia en cada interacción individual es generalmente pequeña, ya que la partícula experimenta un gran número de interacciones antes de gastar su energía cinética. El poder de frenado es el parámetro empleado para describir la pérdida gradual de energía de la partícula cargada a medida que penetra en el medio absorbente. Se conocen dos tipos de poderes de frenado: poder de frenado por colisión (ionización) que resulta de la interacción de la partícula cargada con electrones orbitales del átomo absorbente y poder de frenado radiativo que resulta de la interacción de la partícula cargada con el núcleo del átomo absorbente.

Los poderes de frenado juegan un papel importante en la dosimetría de radiación. Estos dependen de las propiedades de la partícula cargada tales como su masa, carga, velocidad y energía así como también de las propiedades del medio absorbente siendo estas su densidad y número atómico. Adicional a los poderes de frenado, existen otros parámetros de la interacción de partículas cargadas con la materia, tales como el rango, transferencia de energía, potencial de ionización medio, producción de radiación.

3.3.1. Excitación

Las partículas interactúan con los electrones que rodean el núcleo del átomo, transfiriéndoles parte de su energía cinética. Por lo general, la energía transferida hace que el electrón salte a una capa más externa del átomo, y por su inestabilidad regresa a su capa inicial liberando la energía adquirida como un rayo X (rayo X característico) en lo que sería la desexcitación. Ya que la energía adquirida es igual a la diferencia de las energías de enlace de las capas del electrón, dicha energía es característica de cada elemento.



Figura 3.4: *Excitación y Desexcitación*

3.3.2. Ionización

En este caso, la interacción es con los electrones de las capas más externas, pudiendo conseguir sacar un electrón de su capa, de esta manera el átomo queda ionizado. La vacancia es rápidamente llenada con un electrón no ligado. El átomo queda de esta manera cargado positivamente y el electrón liberado es llamado par iónico



Figura 3.5: Ionización

3.4. Producción de Radionúclidos

Existen tres tipos de equipos básicos que se emplean para fabricar núclidos de uso clínico: generadores, ciclotrones y reactores nucleares.

Los generadores son unidades que contienen un núclido 'padre' radiactivo de relativa vida media larga que decaiga a un núclido 'hijo' de vida media corta. El más común es el generador de ^{99}Tc .

Los reactores nucleares contienen grandes átomos inestables que experimentan fisión nuclear, y a través de este proceso o bien de captura electrónica, se producen los núclidos de uso clínico.

Ahora describiremos en detalle el funcionamiento del ciclotrón.

3.4.1. El Ciclotrón

La producción de radionúclidos con un acelerador requiere que el haz de partículas sea entregado con dos características específicas. El haz debe tener energía suficiente para que se lleven a cabo las reacciones nucleares requeridas, y suficiente corriente del haz para dar el rendimiento práctico.

Está compuesto por una cámara cilíndrica que se encuentra ubicada entre los polos de un electromagneto que se encarga de acelerar partículas cargadas, en este caso iones de hidrógeno.

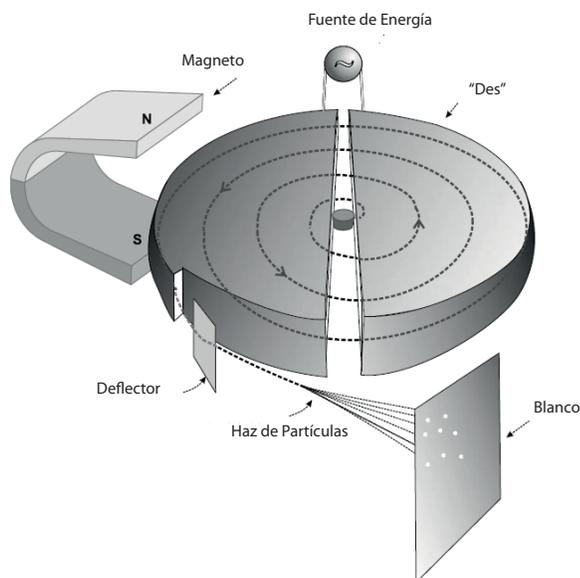


Figura 3.6: *Ciclotrón*

La cámara se encuentra a un alto vacío, en ella se localiza una fuente de iones H^- , que son empleados como proyectiles. El sistema de vacío está diseñado con el propósito de extraer el aire de la cámara de manera tal que los iones H^- no

puedan colisionar con ninguna otra molécula de gas y además, ya que los electrodos están a un potencial tan alto, el vacío funge como aislante a tierra. Se observa en la Figura 3.7 la Unidad de Control de Vacío.

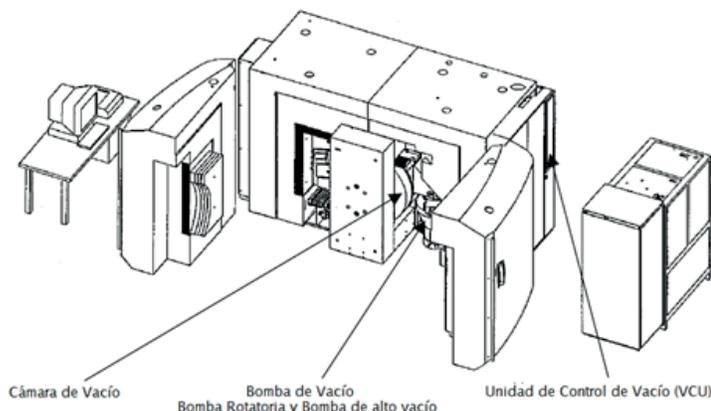


Figura 3.7: *Unidad de Control de Vacío*

A su vez la cámara contiene dos electrodos en forma de “D” (llamados “Des”) que se conectan a una fuente de alto voltaje que oscila a alta frecuencia. En la Figura 3.8 se observa una imagen que hace referencia a los electrodos del ciclotrón.

Cuando el ciclotrón está operativo, la carga eléctrica en los electrodos es alternada debido al voltaje de alta frecuencia. Básicamente se mantiene el mismo campo magnético y se alterna el campo eléctrico entre las Des cada vez que los iones llegan a la cara plana de una de las D logrando así que los iones “salten” a la otra D, sean acelerados siguiendo trayectorias en espiral y aumentando así su energía en el recorrido.

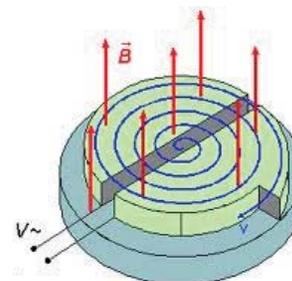


Figura 3.8: *Esquema general de los electrodos de un ciclotrón.*

Cuando alcanzan el borde externo de la cámara, los iones H^- son transformados en protones y son deflectados hacia el blanco. De esta manera, el blanco [agua- ^{18}O] es golpeado por el haz de protones y es así transformado en una sustancia radiactiva de corta vida media emisora de positrones, el ^{18}F .

3.4.2. Descripción del Proceso Químico de Síntesis de FDG.

Tenemos que el FDG es un análogo a la glucosa y como tal es absorbido por las células con alto consumo de ellas tales como el cerebro, el corazón, los riñones y las células cancerosas.

La célula no metaboliza el FDG por lo que una vez que entra a la célula no puede salir de ella hasta que ocurre el decaimiento radiactivo. Con esto se logra un buen reflejo de la absorción de la glucosa por parte de la célula, es decir, se puede detectar glucosa a través de la emisión radiactiva.

Básicamente se miden los fotones que resultan de la destrucción de positrones. Y con técnicas matemáticas de imagen se puede apreciar la distribución del FDG, lo que permite analizar el metabolismo de los tejidos, viendo así cuáles áreas presentan consumo alterado de glucosas.

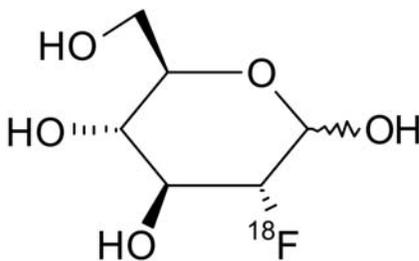


Figura 3.9: Molécula de FDG

El proceso completo de síntesis se lleva a cabo aproximadamente en 28 minutos. A través de sistemas computarizados es posible modificar algunos parámetros y fases de la síntesis, de manera que pueda incrementarse el rendimiento; el proceso de síntesis es controlado y dirigido a través de dichos sistemas por los químicos que operan el ciclotrón. La solución de FDG que se obtiene (16 mL) es limpia, incolora, isotónica y neutra. Además, lista para realizarle el control de calidad. El esquema del proceso químico se aprecia en la Figura 3.10.



Figura 3.10: Esquema del Proceso Químico a través del cual se sintetiza el FDG.

Para producir el radionúclido [^{18}F] se bombardea el [agua- ^{18}O] con protones acelerados. Usualmente, la cantidad de agua irradiada está en el rango entre 0,3

a 4 mL. El bombardeo puede durar hasta 2 horas. El rango de energía de los protones va de 8 a 17 MeV. La cantidad de actividad de ^{18}F recuperada está usualmente entre los 600 y 6000 mCi. Este paso es realizado en el blanco. La prueba sintetizadora, la prueba del cassette y los pasos preliminares de la síntesis pueden llevarse a cabo mientras está en progreso la irradiación del blanco.

Luego del bombardeo, el [agua- ^{18}O] irradiada es transferida al módulo TRACERlab MX_{FDG} (Figura 3.11). Una vez que la síntesis se inicia el [agua- ^{18}O] irradiada pasa a través de un cartucho del intercambio de aniones el cual ha sido condicionado y convertido a la forma de carbonato antes de la síntesis. Los iones de fluoruro ^{18}F son atrapados en el cartucho y el agua enriquecida es recuperada para reutilizarla. Antes de reutilizar el agua enriquecida es necesario purificarla.



(a) Vista referencial del Módulo Sintetizador



(b) Vista de uno de los Módulos Sintetizadores instalados en el CDD

Figura 3.11: Módulo Sintetizador TRACERlab MX_{FDG} .

Posteriormente se eluyen los iones de ^{18}F del cartucho al recipiente de marcado, para esto se emplean 0,6 mL de una solución con 7 mg de carbonato potásico, 22 mg de Kryptofix K222, 300 μL de agua y 300 μL de acetonitrilo. El Kriptofix es

nuevamente necesario en una de las etapas posteriores para la reacción de marcado en el precursor de triflato de manosa en el recipiente de reacción, la manosa es el azúcar precursor de la glucosa.

Una vez que se ha transferido el eluyente que contiene la actividad ^{18}F al recipiente de la reacción, los solventes se evaporan hasta su secado. El secado debe ser completo, ya que cualquier resto de humedad afectaría el rendimiento del marcado. Esta etapa tiene una duración aproximada de 9 minutos.

Después se lleva a cabo el marcado del precursor de triflato de manosa (25 mg), disuelto automáticamente en unos 3,5 mL de acetonitrilo durante las etapas preliminares, se añade al residuo seco. La reacción de marcado constituye la etapa más importante de la síntesis de FDG, cualquier resto de humedad o impureza en el precursor del triflato de manosa, el acetonitrilo, la mezcla de eluyente, el nitrógeno, el cartucho de intercambio de aniones o el cassette puede reducir el rendimiento del marcado. Durante esta etapa, los cartuchos de fase invertida (el de hidrólisis y el de purificación) se enjuagan con 10 mL de agua. Ambos cartuchos están tratados con 3 mL de etanol y 22 mL de agua. Luego se transfiere la solución de neutralización (5 mL de búfer de citrato y 1 mL de HCl 2N) de su frasco a la jeringa de 30 mL, en la parte derecha del módulo sintetizador. Esta etapa dura 4 minutos.

Seguidamente se realiza la purificación preliminar, en esta etapa la solución marcada se mezcla con 26 mL de agua y aproximadamente con unos 4 mL de dicha solución diluida se enjuaga el recipiente donde se llevó a cabo la reacción para recuperar la actividad restante. La solución atraviesa el cartucho de fase invertida utilizado después para la etapa de hidrólisis. La solución de 2- ^{18}F fluoro-1,3,4,6-tetra-O-acetilo-D-glucosa queda atrapada en el cartucho. Los solventes, iones ^{18}F

que no han hecho reacción, Kryptofix y productos derivados se envían a la botella de residuos externa. El producto intermedio se pre-purifica cuando queda atrapado el precursor marcado en el cartucho tC18. Y este cartucho se enjuaga cuatro veces con 10 mL, 10 mL, 13 mL y 13 mL de agua. Una parte del agua se emplea para enjuagar el recipiente de reacción y recuperar la actividad residual en el mismo, todo este proceso se lleva a cabo aproximadamente en 5 minutos.

El precursor marcado fijado al cartucho se convierte en FDG a través de la eliminación de los cuatro grupos protectores de acetilo, mediante hidrólisis alcalina. Se realiza a temperatura ambiente, con 750 μL de NaOH 2N en aproximadamente 2 minutos.

Finalizada la hidrólisis, la solución alcalina se recoge en 7 mL de agua y se mezcla con la solución neutralizadora (5 mL de solución bufer de citrato y 1 mL de HCl 2N). la solución FDG resultante neutralizada se purifica al atravesar un segundo cartucho tC18 que retiene compuestos parcialmente hidrolizados y productos no derivados polares, atravesando un cartucho de óxido de aluminio N que retiene los últimos restos de iones de fluoruro ^{18}F que no han hecho reacción, y atravesando finalmente un filtro de 0,22 μm ventilado.

Finalmente el cassette, los cartuchos y el filtro se enjuagan con 3 mL de agua para recuperar la solución de FDG residual de las líneas y drenarla hacia el vial final.

3.5. Dosis en los Cultivos

Suponemos que el medio a considerar es en su totalidad tejido equivalente con una densidad igual a la del agua. El vial tiene inicialmente una concentración

de ^{18}F (número de núcleos por unidad de volumen) de n_{0V} y un volumen V_V . Si la constante de desintegración del ^{18}F es λ , la actividad inicial A_0 del vial corresponde a:

$$A_0 = n_{0V} V_V \lambda \quad (3.5.1)$$

La actividad $A(t)$ y la concentración $n_V(t)$ de ^{18}F en el vial en función del tiempo corresponden a:

$$A(t) = A_0 e^{(-\lambda t)} = n_0 V_V \lambda e^{(-\lambda t)} \quad (3.5.2)$$

$$n_V(t) = n_{0V} e^{(-\lambda t)} \quad (3.5.3)$$

En la práctica vamos a verter una fracción f del volumen del vial en un medio de cultivo que tiene un volumen V_{MC} . El volumen final V_F es igual a

$$V_F = V_{MC} + f V_V \quad (3.5.4)$$

Si se supone que la difusión en el medio de cultivo es muy rápida y que el tiempo para que se haga homogénea la concentración es despreciable en comparación con los tiempos relevantes del experimento, la concentración de ^{18}F en el nuevo medio de cultivo viene dada por

$$\tilde{n}(t) = \frac{f V_V}{V_{MC} + f V_V} n_{0V} e^{(-\lambda t)} \quad (3.5.5)$$

y la actividad del cultivo completo por

$$\tilde{A}(t) = f n_{0V} V_V \lambda e^{(-\lambda t)} \quad (3.5.6)$$

La tasa de dosis en el cultivo completo se puede escribir como

$$D(t) = \frac{p_{\beta}^+ \langle E_{\beta}^+ \rangle f n_{0V} V_V \lambda e^{(-\lambda t)}}{\rho (V_{MC} + f V_V)} \quad (3.5.7)$$

Donde p_{β}^+ es la probabilidad de emisión del positrón cuando la desintegración tiene lugar, $\langle E_{\beta}^+ \rangle$ es la energía promedio de salida (hay que recordar que hay un espectro ya que la desintegración genera tres cuerpos y el neutrino se lleva cantidad de movimiento y energía que no queda en el medio) del positrón del ^{18}F , y ρ es la densidad másica del medio de cultivo modificado. Esta densidad podemos aproximarla a la del agua. La dosis absorbida durante toda la desintegración en el medio de cultivo modificado corresponde a integrar la tasa de dosis de la ecuación 3.5.7 para obtener

$$D_{total} = \frac{n_{0V}}{\rho} \langle E_{\beta}^+ \rangle \frac{p_{\beta}^+ + f V_V}{V_{MC} + f V_V} = f \frac{p_{\beta}^+ \langle E_{\beta}^+ \rangle}{\rho \lambda (V_{MC} + f V_V)} A_0 = \frac{p_{\beta}^+ \langle E_{\beta}^+ \rangle}{M_V \lambda \left(1 + \frac{V_{MC}}{f V_V}\right)} A_0 \quad (3.5.8)$$

donde M_V es la masa del vial original. Vamos a examinar el cultivo cuando la desintegración haya “terminado” (lo que ocurre realmente a tiempo infinito) o de manera equivalente, cuando hayan transcurrido más de 10 medias vidas del ^{18}F (lo que equivale a medio día o más).

Para determinar los valores a usar en la desintegración recurrimos a la tabla presentada en INTERNET por la Korean Atomic Energy Research Institute (KAERI).

Vemos que el esquema para la desintegración corresponde a la situación donde la emisión del positrón (que siempre va a competir con captura electrónica) tiene una probabilidad de ocurrencia dada por $p_{\beta^+} = 0,9673\dots$ y $\langle E_{\beta^+} \rangle = 249,8 \pm 0,3 \text{ keV}$. La media vida corresponde a $T_{1/2} = 109,77 \pm 0,05 \text{ min}$.

Los valores tabulados permiten obtener

$$\frac{\rho \langle E_{\beta^+} \rangle}{\lambda} = 0,9673 \times \frac{109,77}{0,693} \times 60 \times 2,498 \times 10^5 \times 1,6022 \times 10^{-19} \text{ Js} = 3,679 \dots \times 10^{-10} \text{ Js} \quad (3.5.9)$$

La ecuación 3.5.9 nos lleva a una relación entre la dosis absorbida total y la actividad inicial dada por

$$D_{total} = \frac{3,679 \times 10^{-10}}{M_V(\text{en kg}) \left(1 + \frac{V_{MC}}{fV_V}\right)} A_0(\text{en Bq}) \text{ Gy} \quad (3.5.10)$$

Es pertinente recordar la relación entre las unidades de actividad como son el curie y el becquerel, es decir

$$1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq} = 37 \text{ GBq} \quad 1 \text{ Bq} = 2,7 \times 10^{-10} \text{ Ci} = 2,7 \times 10^{-7} \text{ mCi} = 2,7 \times 10^{-4} \text{ Ci} \quad (3.5.11)$$

Con las ecuaciones 3.5.10 y 3.5.11 se realizaron los cálculos para el diseño de los experimentos.

RADIOBIOLOGÍA

4.1. Células Madre y Células Clonogénicas

4.1.1. Células Madre

Las células madre son células que tienen la capacidad de mantener su número y a la vez producir células que pueden diferenciarse y proliferar el resto de la población celular funcional, ellas constituyen la base de la jerarquía celular que componen los tejidos hematopoyéticos y epiteliales [18].

4.1.2. Células Clonogénicas

Son células capaces de formar colonias dentro de cierto ambiente de crecimiento. Una célula clonogénica es aquella capaz de formar una numerosa progenie a partir de una sola célula [18].

El mantenimiento del tamaño del tejido, y así la función del tejido, en la renovación normal de los tejidos del cuerpo depende de la existencia de un pequeño número de células madre primitivas. Son células con capacidad proliferativa ilimi-

tada que son la base de la jerarquía celular que componen los tejidos epiteliales y hematopoyéticos del cuerpo. Los carcinomas se derivan de tales tejidos jerárquicos, y la capacidad de reconocerlos en secciones histológicas deriva del hecho de que los tumores frecuentemente mantienen muchas de las características de diferenciación del tejido dentro del cual surgieron. Tumores bien diferenciados hacen esto en mayor medida que los anaplásicos. Esto indica que no todas las células en un tumor son células madre neoplásicas; algunas se han embarcado en un proceso irreversible de diferenciación. Adicionalmente, los carcinomas contienen muchas células hospedadoras normales que componen el estroma (fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, etc.). Para algunos resulta una sorpresa que la mayoría de las células que componen el volumen de muchos tumores no son malignas. Si esas células no-malignas fuesen las únicas que quedarán intactas al final de la terapia, entonces el tumor no regresaría. El crecimiento tumoral es dirigido por las células madre neoplásicas, y es así como debe ser erradicado.

Luego de la exposición a una dosis terapéutica de radiación, las células dañadas no mueren inmediatamente, y pueden producir una modesta familia de descendientes.

4.2. Ensayos Clonogénicos

A través de la realización de ensayos clonogénicos ha sido posible construir la base de los estudios de la respuesta celular en tumores así como en algunos tejidos normales. La idea básica es remover células del tumor, colocarlas en un ambiente de crecimiento definido y probar su capacidad de producir una colonia definida de

descendientes.

Para esto se cuenta con una suspensión de células tumorales que será dividida en dos grupos, de tal manera que sea posible irradiar un grupo y que el otro permanezca como grupo de control, habiendo crecido y evolucionado ambos grupos bajo idénticas condiciones con la diferencia fundamental de que el grupo sometido a irradiación ha perdido parte de su población.

Una vez irradiadas las células y habiendo esperado un tiempo prudencial, se procede a la medición de la absorbancia a través de la técnica de espectrofotometría, la absorbancia es un número proporcional a las células viables presentes en el cultivo, es decir, al número de células vivas para finalmente calcular la fracción de supervivencia que corresponde a:

$$f = \frac{\rho}{\rho_c} \quad (4.2.1)$$

donde ρ es la absorbancia de las células irradiadas y ρ_c es la absorbancia de las células de control

La irradiación no sólo reduce el número de colonias; también produce efectos no letales que cambian la distribución del tamaño de la colonia a valores más pequeños. Algunas de esas colonias pequeñas pueden representar clones que eventualmente mueren; otras pueden surgir de células que, como resultado del daño no letal, han reducido su tasa de crecimiento colonial. Sin embargo, la implicación de esas colonias parcialmente viables para la evaluación de los efectos de la radiación en tumores puede ser dignos de gran atención.

El desarrollo de un cultivo más allá de su cultivo primario resulta en una línea celular. La importancia de la línea celular radica en su capacidad de proveer una fuente renovable de material celular para la repetición de estudios [14].

4.3. Curvas de Supervivencia

Una curva de supervivencia celular es un gráfico de la fracción de supervivencia contra la dosis. En escalas lineales, la curva de supervivencia para células irradiadas son frecuentemente de forma sigmoidea: tienen un hombro seguido por una curva que se aproxima asintóticamente a cero. Indica que la sensibilidad de las células a la radiación, los valores de ED_{50} o ED_{90} , puede leerse del gráfico. (ED_{90} es la dosis necesaria para matar el 90% de las células).

Hay dos razones por las cuales las curvas de supervivencia son usualmente graficadas en escala logarítmica:

- Si la muerte celular es el resultado de eventos de radiación aleatorios de un solo impacto entonces la curva de sobredosis será una función exponencial de la dosis. Esto será una línea recta en un gráfico semi log.
- Una escala logarítmica permite mostrar más fácilmente efectos en los niveles de supervivencia muy bajos para ser mostrados y comparados. Esto es importante porque la erradicación de un tumor necesita muchos ordenes de magnitud de muerte celular.

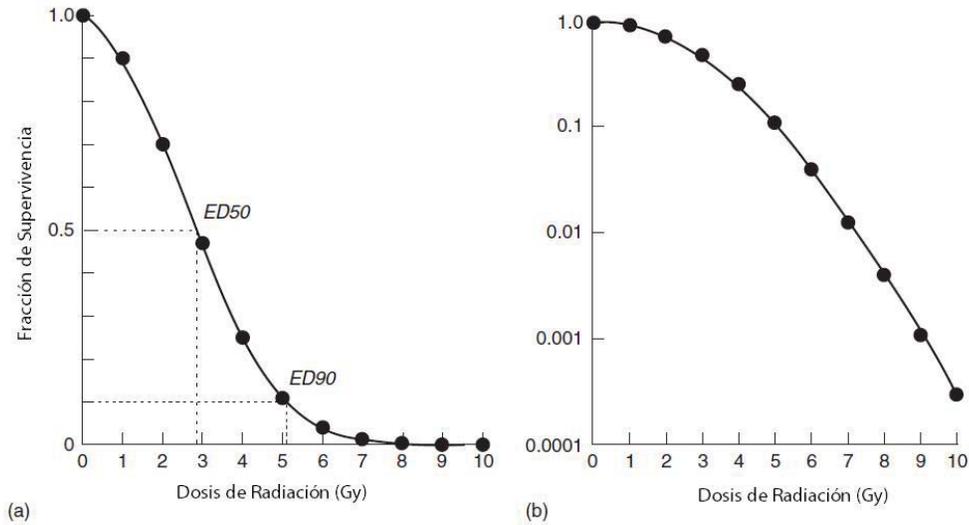


Figura 4.1: Típica curva de supervivencia celular para células irradiadas en cultivos de tejidos, (a) graficada en escala lineal; (b) la misma gráfica en escala logarítmica.

4.4. Muerte Celular

El propósito de emplear radiación ionizante en el tratamiento del cáncer es fundamentalmente la capacidad que ésta tiene para causar muerte celular en células tumorales. Existen diversos mecanismos a través de los cuales se produce muerte celular:

- AUTOFAGIA
- APOPTOSIS
- NECROSIS

4.4.1. Autofagia

A través de este proceso las células envuelven y degradan su propio citoplasma dentro de vacuolas. Cuando se observa una vacuolización celular anormal estamos ante la presencia de la autofagia, a diferencia de la apoptosis este mecanismo se da a lugar dentro de la célula y no dentro del medio que envuelve a la célula.



Figura 4.2: Vista esquemática del proceso de autofagia.

4.4.2. Necrosis

Este mecanismo de muerte celular es el más agresivo, la membrana celular se rompe y todo el contenido celular es desechado al medio, observándose inflamación por el impacto tóxico que esto conlleva.

4.4.3. Apoptosis

Este mecanismo también se conoce como muerte celular programada, y puede ser el resultado de algunas condiciones dentro de la célula por ejemplo, daño en el ADN o por señales generadas del exterior. La célula encapsula el contenido citoplasmático en varios "paquetes" que se conocen como cuerpos apoptóticos, dichos cuerpos son luego fagocitados de manera natural por organelos presentes en el medio y de esta manera no se presenta la inflamación que produce la muerte celular por necrosis, es como un producto de desecho que el medio está preparado para eliminar sin impacto negativo en el organismo.

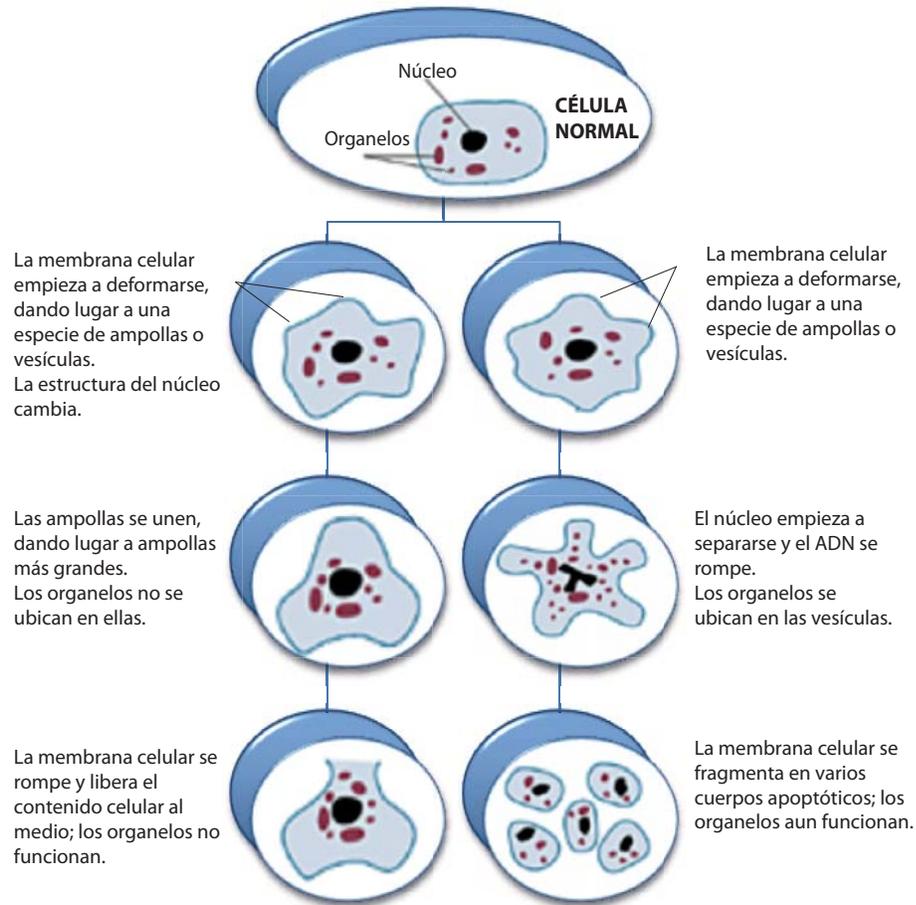


Figura 4.3: Mecanismos de muerte celular: a la izquierda la necrosis y a la derecha la apoptosis.

4.5. Efecto Bystander

El efecto bystander se refiere a la inducción de efectos biológicos en células que no han sido directamente atravesadas por alguna partícula cargada. La información disponible concerniente al efecto bystander se separa en dos categorías, y no

existe la certeza de que ambos grupos de experimentos estén presenciando el mismo fenómeno. Primero, están los experimentos que involucran la transferencia del medio de las células irradiadas, las cuales resultan en un efecto biológico en células no irradiadas. Segundo, existe el uso de sofisticados microhaces de únicas partículas, que permiten que células específicas sean irradiadas y se estudien los efectos biológicos en sus vecinas; en este caso la comunicación es a través de las uniones gap. Los experimentos de transferencia del medio han mostrado un efecto bystander para la letalidad celular, aberraciones cromosómicas y retraso del ciclo celular [6].

Tenemos en la figura 4.4 el esquema seguido en los experimentos realizados con microhaces, la imagen en el esquema muestra los resultados obtenidos.

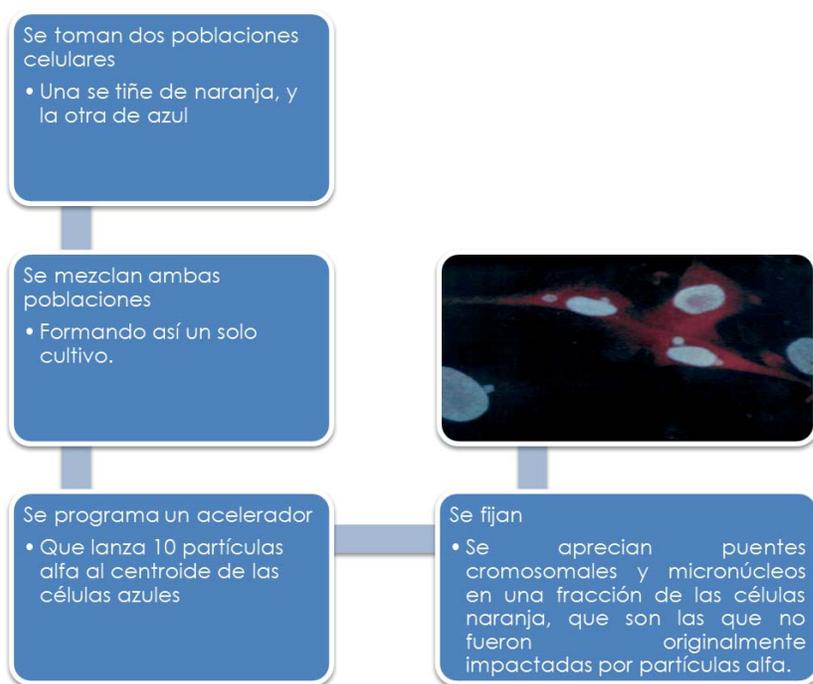


Figura 4.4: Esquema del Experimento con microhaces.

En la figura 4.5 observamos las células a las que impacta la radiación y a través de ciertos canales intracelulares se transmiten señales.



Figura 4.5: Transferencia de señales celulares.

En la figura 4.6 se muestran los resultados obtenidos en el experimento con microhaces y se puede observar la respuesta evidenciada por las células impactadas por las partículas α y las no impactadas.

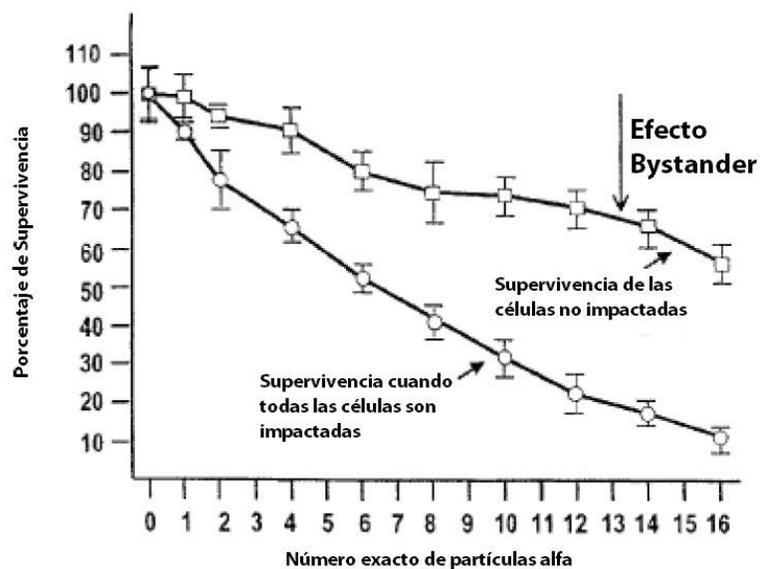


Figura 4.6: Resultados del experimento con microhaces

Para dar una idea general, tenemos 2 cápsulas, una la mantenemos como cápsula de control y la otra es sometida a radiación después de un corto tiempo de incubación, 48 horas, se coloca medio de cultivo procedente de las células que fueron irradiadas en la cápsula de control y se puede observar que al poco tiempo estas últimas manifiestan signos de radiación. Esto se esquematiza en la Figura 4.7.

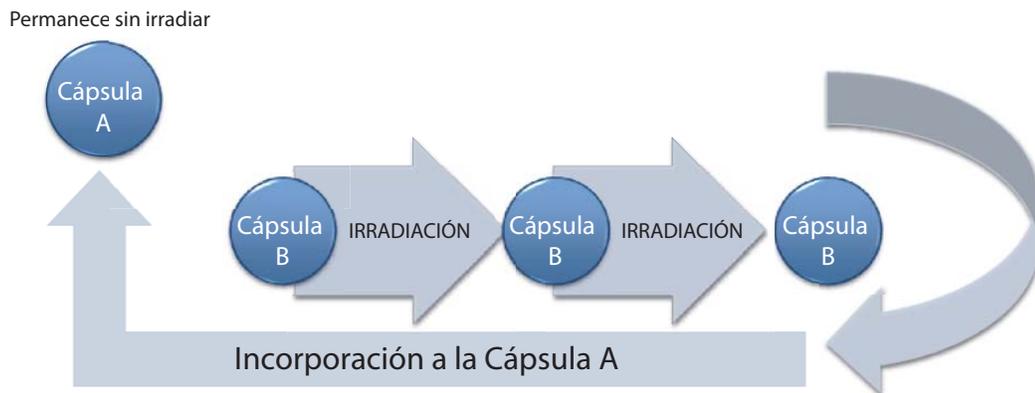


Figura 4.7: Representación esquemática del efecto “Bystander” a través del traspaso de medios de cultivo.

En [13] y [12] se expresa una posible explicación al mecanismo asociado a la señalización presente en el efecto, los micro ARNs.

En este trabajo se realizaron ensayos Clonogénicos para evaluar el efecto Bystander al transferir medio de células irradiadas con FDG a células no irradiadas una vez decaído el radiofármaco.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1. Cálculo de Dosis

Para llevar a cabo la irradiación se realizaron cálculos previamente, de manera tal que pudiera determinarse la actividad de radiofármaco necesaria para la dosificación. La columna correspondiente a volumen del vial en las Tablas 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, corresponde a volúmenes aproximados, los volúmenes exactos se calculaban en el CDD a través de la hoja de cálculo que manejan para sus dosificaciones, en la Figura 5.1 se observa una de las hojas de cálculo, específicamente corresponde al cálculo de la línea 3T3 en la primera Fase a altas dosis, las celdas que aparecen sombreadas son los datos que deben introducirse en la hoja, en la primera fila se colocan los datos correspondientes a la lectura del radiofármaco en el activímetro: actividad en mCi, volumen en el que se encuentra y hora de la lectura. En las filas siguientes se indica que actividad se quiere tomar, a qué hora se desea entregar y de manera automática son calculados los campos restantes.

Hora	Min	Fracción de Hora	Actividad en el Vial (mCi)	Dosis (mCi)	Actividad Residual vial (mCi)	Vo Vial (mL)	V dosis (mL)	V dosis (uL)
15	40	15,67	50		50	16,000		
15	55	15,92	45	2,108	43,4	16,000	0,741	741
15	55	15,92	43	2,108	41,3	15,259	0,741	741
15	55	15,92	41	2,108	39,2	14,517	0,741	741
15	55	15,92	39	2,108	37,0	13,776	0,741	741
16	0	16,00	36	1,317	34,6	13,034	0,478	478
16	0	16,00	35	1,317	33,3	12,556	0,478	478
16	0	16,00	33	1,317	31,9	12,078	0,478	478
16	0	16,00	32	1,317	30,6	11,599	0,478	478
16	5	16,08	30	0,823	28,9	11,121	0,309	309
16	5	16,08	29	0,823	28,0	10,813	0,309	309
16	5	16,08	28	0,823	27,2	10,504	0,309	309
16	5	16,08	27	0,823	26,4	10,196	0,309	309
16	10	16,17	26	0,515	25,0	9,887	0,199	199
16	10	16,17	25	0,515	24,5	9,688	0,199	199
16	10	16,17	25	0,515	24,0	9,489	0,199	199
16	10	16,17	24	0,515	23,5	9,290	0,199	199
16	15	16,25	23	0,322	22,5	9,091	0,128	128
16	15	16,25	22	0,322	22,1	8,963	0,128	128
16	15	16,25	22	0,322	21,8	8,834	0,128	128
16	15	16,25	22	0,322	21,5	8,706	0,128	128
16	20	16,33	21	0,201	20,6	8,578	0,083	83
16	20	16,33	21	0,201	20,4	8,495	0,083	83
16	20	16,33	20	0,201	20,2	8,412	0,083	83
16	20	16,33	20	0,201	20,0	8,329	0,083	83

Figura 5.1: Imagen donde se aprecian los elementos de la hoja de trabajo empleada en el CDD

En las subsecciones que siguen a continuación se presentan dos tablas por grupo a dosificar, en la primera se indican los datos a considerar para la ecuación 3.5.10, y en la segunda los rangos de actividad y dosis de cada grupo.

5.1.1. Fase de Prueba

V_{MC} (mL)	V_V (mL)	M_V (kg)	A_0 (mCi)	C_0
1,00	10,00	0,0184873	32,7	$3,679 \times 10^{-10}$

Tabla 5.1: Datos Fase de prueba

f_V	D (Gy)	V del vial (μ L)	Actividad (mCi)
0,0062	1,41	62	0,203
0,0087	1,93	87	0,285
0,0112	2,43	112	0,367
0,0136	2,89	136	0,445
0,016	3,33	160	0,524
0,0183	3,73	183	0,599

Tabla 5.2: Cálculo de Dosis en la Fase de Prueba

5.1.2. Primera Fase

Línea 3T3

Dosis (Placa)	V_{MC} (mL)	V_V (mL)	M_V (kg)	A_0 (mCi)	C_0
Bajas	0,500	16,00	0,0184873	0,000819	$3,679 \times 10^{-10}$
Media-Altas				45,48	

Tabla 5.3: Datos Primera Fase de la línea 3T3

Dosis (Placa)	f_V	D (Gy)	V del vial (μ L)	Actividad (Ci)
Bajas	0,006	$9,86 \times 10^{-5}$	98	$5,00 \times 10^{-9}$
	0,018	$2,19 \times 10^{-4}$	286	$1,46 \times 10^{-8}$
	0,023	$2,57 \times 10^{-4}$	372	$1,90 \times 10^{-8}$
	0,030	$2,96 \times 10^{-4}$	483	$2,47 \times 10^{-8}$
	0,039	$3,36 \times 10^{-4}$	628	$3,21 \times 10^{-8}$
Media-Altas	0,004	4,15	71	0,071
	0,007	6,18	113	0,113
	0,011	8,90	181	0,181
	0,018	12,28	290	0,290
	0,029	16,11	463	0,463
	0,046	20,00	741	0,741

Tabla 5.4: Cálculo de Dosis en la Primera fase para la línea 3T3

Línea HT-29

Dosis (Placa)	V_{MC} (mL)	V_V (mL)	M_V (kg)	A_0 (mCi)	C_0
Bajas	0,500	16,00	0,0184873	0,000819	$3,679 \times 10^{-10}$
Media-altas				17,6	

Tabla 5.5: Datos Primera Fase de la línea HT-29

Dosis (Placa)	f_V	D (Gy)	V del vial (μ L)	Actividad (Ci)
Bajas	0,006	$9,86 \times 10^{-5}$	98	$5,00 \times 10^{-9}$
	0,018	$2,19 \times 10^{-4}$	286	$1,46 \times 10^{-8}$
	0,023	$2,57 \times 10^{-4}$	372	$1,90 \times 10^{-8}$
	0,030	$2,96 \times 10^{-4}$	483	$2,47 \times 10^{-8}$
	0,039	$3,36 \times 10^{-4}$	628	$3,21 \times 10^{-8}$
Media-Altas	0,006	2,05	94	0,104
	0,009	3,00	150	0,166
	0,015	4,22	240	0,265
	0,024	5,65	385	0,424
	0,038	7,17	615	0,679
	0,062	8,61	985	1,086

Tabla 5.6: Cálculo de Dosis en la Primera fase para la línea HT-29

5.1.3. Segunda Fase

V_{MC} (mL)	V_V (L)	M_V (kg)	A_0 (mCi)	C_0
0,500	20,00	0,0184873	0,00175	$3,679 \times 10^{-10}$

Tabla 5.7: Datos para la segunda fase a bajas dosis de la línea HT-29

	f_V	D (Gy)	V del vial (μ L)	Actividad (mCi)
Placa 1	0,0040	$9,46 \times 10^{-5}$	39,7	0,000007
	0,0099	$2,13 \times 10^{-4}$	99,3	0,000017
	0,0225	$3,99 \times 10^{-4}$	225	0,000039
	0,0450	$6,09 \times 10^{-4}$	450	0,000079
	0,0900	$8,27 \times 10^{-4}$	900	0,000157

Tabla 5.8: Cálculo de Dosis (bajas) en la Primera fase para la línea HT-29

V_{MC} (mL)	V_V (mL)	M_V (kg)	A_0 (mCi)	C_0
0,500	20,00	0,0184873	42,24	$3,679 \times 10^{-10}$

Tabla 5.9: Datos para la segunda fase a dosis media-altas de la línea HT-29

	f_V	D (Gy)	V del vial (μL)	Actividad (mCi)
Placa 2	0,00041	0,496	8,10	0,017
	0,00065	0,786	13,0	0,027
	0,00104	1,239	20,7	0,044
	0,00166	1,936	33,2	0,070
	0,00347	3,791	69,4	0,147
Placa 3	0,00425	4,517	85,0	0,179
	0,00573	5,804	115	0,242
	0,00774	7,354	155	0,327
	0,01045	9,170	209	0,441
	0,01411	11,221	282	0,596
Placa 4	0,01905	13,451	381	0,805
	0,02381	15,173	476	1,006
	0,02976	16,905	595	1,257
	0,03720	18,603	744	1,572
	0,04650	20,229	930	1,964

Tabla 5.10: *Cálculo de Dosis (media-altas) en la segunda fase para la línea HT-29*

5.2. Procedimiento

5.2.1. Fase de Prueba

Fue diseñada con el propósito de establecer el esquema a seguir en la primera fase ya que era necesario elaborar un protocolo adecuado para los experimentos, según los inconvenientes que se desarrollaran en esta etapa se ajustaría la siguiente.

Se seleccionó la línea celular 3T3, debido a que para la fecha de realización del experimento la otra línea celular presentó contaminación, fue descartada y se había solicitado nuevamente al IVIC.

Una manera esquemática de ver el proceso completo llevado a cabo en esta fase se observa en la Figura 5.2.



Figura 5.2: Esquema

Se sembraron dos placas de 24 pozos con células 3T3. Es importante destacar que al trabajar con cultivos celulares es sumamente importante mantener la asepsia y la esterilidad, razón por la cual se trabaja bajo campana laminar SIEMPRE. El procedimiento empleado se describe a continuación.

- Se temperó medio nutritivo DMEM, tripsina y PBS cinco minutos antes de iniciar el procedimiento en la campana de flujo laminar.
- Se encendió el flujo de la campana y se apagó la luz ultravioleta.
- Se seleccionaron los instrumentos y materiales a emplear bajo la campana y

fueron lavados con etanol al 70% antes de ingresarlos a la campana.



Figura 5.3: Parte de los materiales empleados, antes de ingresarlos a la campana de flujo laminar, IBE.

- De la misma manera, previamente se higienizaron las manos con alcohol.
- Bajo la campana de flujo laminar se descartó el medio de cultivo en el envase seleccionado para este fin.
- Se lavó el frasco de cultivo con 2,5 mL de PBS dos veces y se descartó, para esto se empleó el pipeteador automático y una pipeta graduada de 5 mL, este lavado se hace con la finalidad de eliminar cualquier rastro de Suero Fetal Bovino (SFB) presente en el medio de cultivo ya que inhibe la acción de la tripsina.
- Se agregaron 2 mL de tripsina previamente temperada, se cerró el frasco y se llevó a la incubadora por cinco minutos.

- Se verificó la disgregación celular al microscopio y se agregaron 2 mL de DMEM para que el SFB inhibiese la acción de la tripsina.
- Empleando la misma pipeta se resuspendió varias veces el volumen contenido en el frasco y se trasvasó a un tubo de centrifuga.
- Se selló el tubo de centrifuga y se llevó a la balanza de dos platos, para ello se dispone de dos recipientes de igual peso y dimensiones, se colocó el tubo en una camisa de acero inoxidable y luego en uno de los recipientes colocado en la balanza y en el otro un tubo de centrifuga con agua, la cual se completó gota a gota hasta igualar los pesos de ambos tubos, como se aprecia en la Figura 5.4. Todo esto debido a que en la centrifuga deben colocarse los tubos en pareja y ubicarlos diametralmente opuestos, en la Figura 5.5 se puede apreciar la ubicación en la centrifuga de una pareja tubo-camisa y en el extremo opuesto otra camisa en la que se colocó el otro tubo.

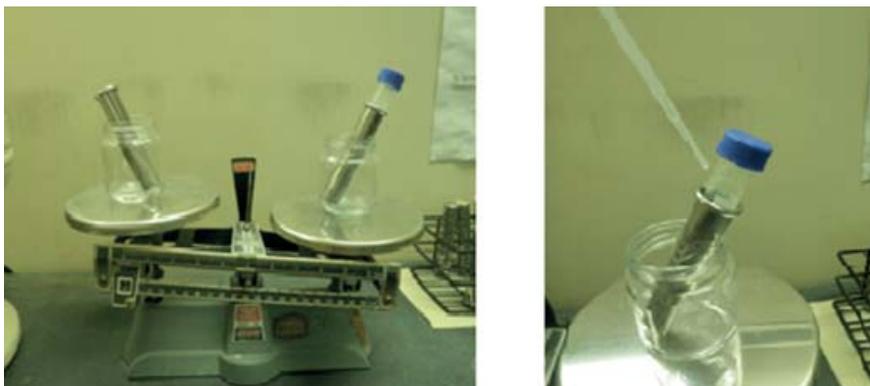


Figura 5.4: *En la imagen de la izquierda la balanza de dos platos, y en la imagen de la derecha el gotero con el que se equilibra el peso de los tubos de ensayo, IBE.*



Figura 5.5: Forma correcta de ubicar tubos dentro de la centrífuga, IBE.

- Se procedió a centrifugar la suspensión celular por cinco minutos a una velocidad de 2.500 rpm.
- La finalidad del proceso de centrifugado es lograr que las células se depositen en el fondo del tubo formando así lo que se conoce como “taco celular”, este taco se puede apreciar en la Figura 5.6.

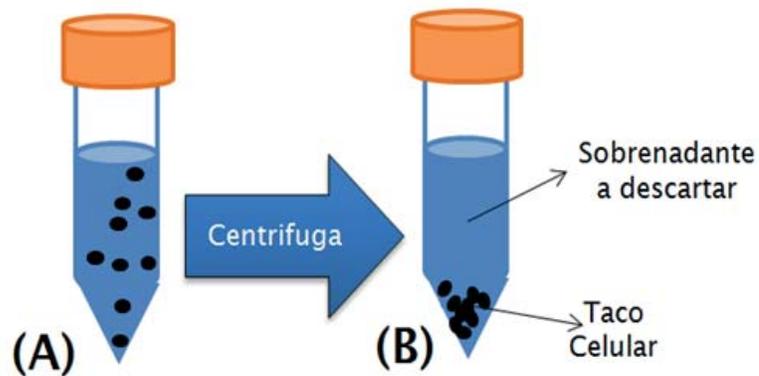
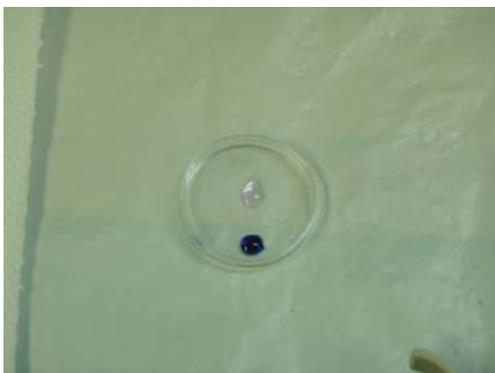
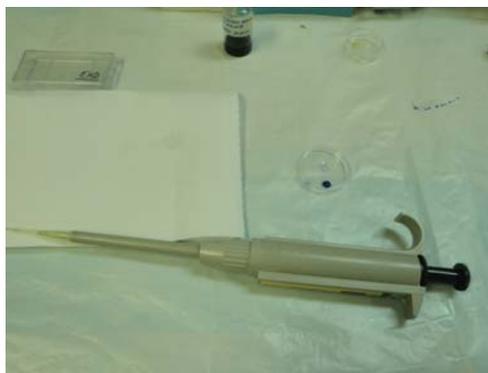


Figura 5.6: (A) Suspensión celular en el tubo de centrifugado (antes de centrifugar). (B) Taco celular en el fondo del tubo de centrifugado (después de centrifugar).

- Se llevó el tubo de centrifugado nuevamente a la campana de flujo laminar y se descartó el sobrenadante, el taco celular permanece en el fondo del tubo.
- Se agregaron 3 mL de medio DMEM empleando una pipeta graduada estéril y el pipeteador automático y se resuspendió varias veces con la finalidad de homogenizar la nueva suspensión.
- Con una micropipeta se tomó una alícuota de 20 μL de la suspensión y se colocó en una cápsula de Petri, se le adicionaron 20 μL de azul de tripano. En la figura 5.7 se muestran las alícuotas en la cápsula.



(a) Cápsula de Petri donde se aprecian las alícuotas de la suspensión celular y del colorante



(b) Área de trabajo e implementos utilizados

Figura 5.7: Coloración para el conteo celular, IBE.

- Se resuspendieron estos 40 μL de nueva suspensión, se tomó una nueva alícuota y se agregó en la cámara de Neubauer.
- Se llevó la cámara al microscopio óptico y se contabilizaron las células en cuatro cuadrantes de la cámara, para luego promediar el valor.

Lecturas	Promedio
42	
32	39,5
41	
43	

- La densidad celular (D_c) por mL presentes se calculó a través de la relación:

$$D_c/mL = Promedio \times 2 \times 10^4 \quad (5.2.1)$$

De esta manera, tenemos:

$$\Rightarrow D_c/mL = 39,5 \times 2 \times 10^4 = 7,9 \times 10^5 \text{ células/mL}$$

- Luego, el número total de células en el volumen total de suspensión (N_{C_T}):

$$N_{C_T} = D_c/mL \times V_T \quad (5.2.2)$$

Por lo tanto, en este caso:

$$N_{C_T} = 7,9 \times 10^5 \text{ células/mL} \times 3 \text{ mL} = 2,37 \times 10^6 \text{ células}$$

- Se hicieron los cálculos para sembrar un aproximado de 20.000 células por pozo, de esta manera:

$$2 \text{ placas}_{24} \times \text{ pozos} = 48 \text{ pozos}$$

$$\Rightarrow 20,000 \text{ células} \times 48 \text{ pozos} = 960,000 \text{ células}$$

- Se tenían entonces 2.370.000 células en 3 mL, a través de una regla de tres simple se determinó la alícuota necesaria a tomar para realizar la siembra:

$$\begin{array}{rcl} 2.370.000 & \text{—} & 3 \text{ mL} \\ 960.000 & \text{—} & x \quad \Rightarrow \quad x = 1,215 \text{ mL} \end{array}$$

- Considerando que se sembraría un volumen por pozo de 1 mL, se hizo el cálculo correspondiente del medio nutritivo DMEM a utilizar, teniendo en cuenta el volumen total de suspensión celular a preparar:

$$48 \text{ pozos} \times 1 \text{ mL} = 48 \text{ mL}$$

Luego, sabemos que de dicho volumen hay 1,215 mL correspondientes a la alícuota a tomar del tubo de centrifuga, por lo tanto, la cantidad de medio necesario sería:

$$48 \text{ mL} - 1,215 \text{ mL} = 46,785 \text{ mL}$$

- Se colocaron los 46,785 mL de medio nutritivo DMEM en un beaker.
- Para completar el volumen de suspensión celular necesario para sembrar las placas, se tomó la alícuota de 1,215 mL del tubo de centrifuga (previamente resuspendido, ya que mientras se hizo el conteo se vuelve a sedimentar una parte), se agregaron al vaso de precipitado que contenía el medio nutritivo DMEM y se resuspendieron en el vaso.
- Con una micropipeta se agregó en cada pozo 1 mL de suspensión celular.
- Se rotularon ambas placas, se taparon y se llevaron a la incubadora, donde permanecieron hasta el día siguiente
- Se chequearon las placas al microscopio para luego sellarlas con parafilm, se

envolvieron con papel de aluminio y se colocaron en la cava para transportarlas al CDD. (En dicha cava se colocaron previamente varias capas de gomaespuma que se ajustaron a su espacio interno y se les extrajo el centro para poder encajar las placas en ellas). Esta disposición se aprecia en la Figura 5.8.



(a) Vista superior de la cava vacía, con el soporte extra de gomaespuma.



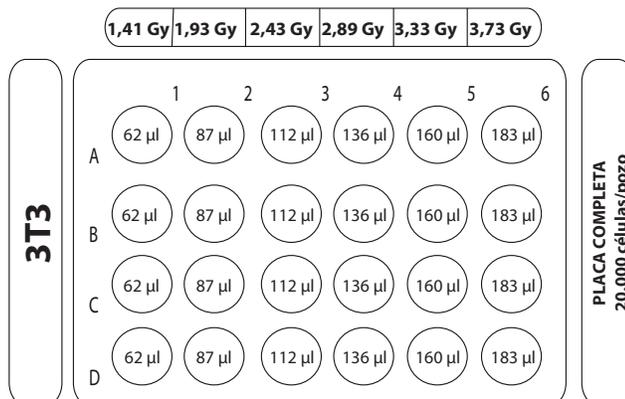
(b) Vista superior de la cava, con las placas apiladas en su interior para el transporte.

Figura 5.8: Cava usada para transportar las placas durante los experimentos.

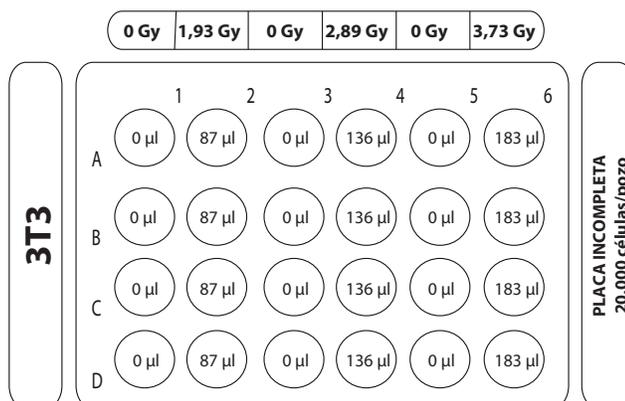
- Se transportaron las placas al CDD y se colocaron en la incubadora disponible, dicha incubadora no trabaja con CO_2 y por esta razón las placas se mantuvieron selladas hasta el momento de la dosificación.
- La dosificación estaba planificada para el día en que se trasladaron las placas, sin embargo, inconvenientes de última hora no permitieron llevarla a cabo. Las placas permanecieron selladas en la incubadora del CDD hasta el día siguiente.

Otro propósito en esta etapa de prueba era determinar si la distribución de dosis afectaba pozos vecinos. De esta manera, se idearon dos configuraciones con el propósito de analizar si existían diferencias en los resultados obtenidos,

una placa sería irradiada por completo y en la otra se haría la irradiación en columnas intercaladas, dichas configuraciones se ilustran en la Figura 5.9.



(a) Placa completamente irradiada.



(b) Placa irradiada únicamente en las columnas 2, 4 y 6 con las mismas dosis de la placa completa.

Figura 5.9: Esquema de distribución de dosis de la fase de prueba

- Con una inyectadora estéril y bajo la campana de flujo laminar se tomaron 2 mL de FDG con una actividad de 36 mCi, luego se diluyeron hasta obtener 10 mL empleando solución isotónica de cloruro de sodio (solución salina).

- Luego se procedió a sembrar en cada pozo los volúmenes que se ilustran en la Figura 5.9 para alcanzar las dosis planificadas, empleando para ello una micropipeta de rango variable entre 50-200 μ L, cambiando la punta para cada pozo. Las puntas empleadas fueron desechadas en un recipiente para tal fin que se encuentra dentro de la campana y que serían eliminadas al día siguiente, una vez decaído por completo el FDG.
- Una vez finalizada la siembra, se taparon las placas, se sellaron con parafilm y se colocaron en la incubadora a 37°C.
- Transcurrieron 4 horas mientras se esperó el decaimiento del radiofármaco, tiempo después del cual se envolvieron nuevamente en papel de aluminio las placas y se ubicaron en la cava para su traslado al IBE.
- En el IBE se chequearon a microscopio y se tomó registro fotográfico de lo observado.
- 3 días después se procedió a detener el proceso, descartando el medio nutritivo para luego lavar dos veces con PBS cada pozo.
- Luego se agregó metanol por cinco minutos para fijar las células y finalmente se adicionó etanol al 70 %, se sellaron las placas con parafilm y se mantuvieron refrigeradas en la nevera.
- Se realizó la coloración May-Grünwald-Giemsa (algunos elementos del proceso de coloración se observan en la figura 5.10):
 - Se cubrió el fondo de cada pozo con colorante May Grünwald, empleando para ello una micropipeta y se dejó actuar por cinco minutos.

- Se preparó la coloración Giemsa en una proporción 1:20, se tomaron para ello 1,5 mL de colorante que se filtraron antes de diluirlos en 30 mL de agua destilada.
- Se descartó el colorante May Grünwald una vez transcurrido el tiempo indicado anteriormente, se lavaron los pozos con agua destilada y se escurrieron sobre toallín las placas.
- Con una micropipeta se agregó la coloración Giemsa en cada pozo, se esperaron 20 minutos para descartarla.



(a) Colorante May Grünwald



(b) Colorante Giemsa



(c) Implementos para el filtrado



(d) Coloración preparada



(e) Placas con la coloración

Figura 5.10: Elementos con los que se realizó el proceso de coloración, IBE.

- Se agregó agua destilada con la piceta en cada pozo y se observaron las placas al microscopio invertido Olympus IX50, tomando registro fotográfico de lo observado.
- Finalizado el registro se descarta el agua y se dejan escurrir las placas para evitar la formación de hongos.

5.2.2. Primera Fase

Para esta etapa del proyecto se planificó sembrar cuatro placas de la línea celular 3T3 y cuatro placas de la línea HT-29, el esquema de siembra se presenta en la Figura 5.11, y basándonos en la información obtenida en la etapa anterior se hicieron algunos cambios en la metodología.



Figura 5.11: Distribución de siembra de placas en la primera fase según línea celular, densidad de siembra y objetivo final.

Entre los elementos de la metodología que se modificaron fueron los días

consecutivos para poder observar detalladamente el proceso, ya que en la fase de prueba la irradiación se realizó un día viernes y debido a ello no fue posible ver resultados 24 horas después. La representación gráfica de lo realizado en esta fase se observa en la Figura 5.12.

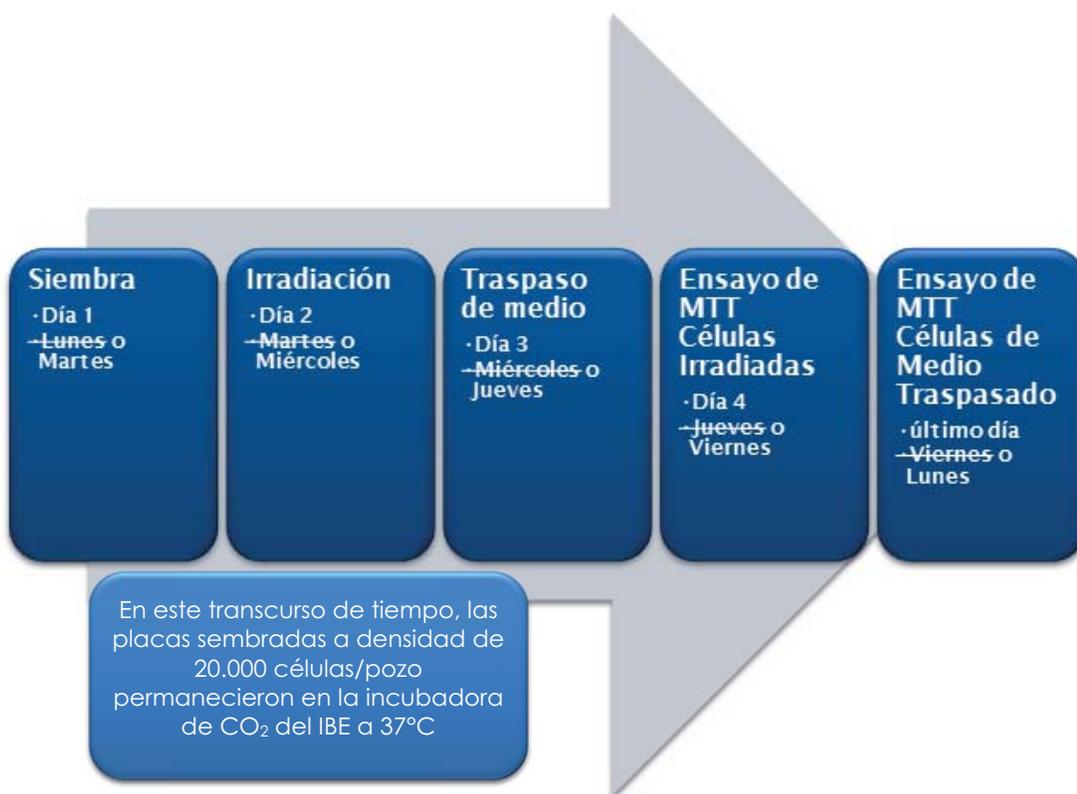


Figura 5.12: Esquema de trabajo en la segunda fase.

Para ambas líneas celulares el procedimiento es bastante parecido y por tanto, se trabajó simultáneamente bajo la campana, es decir, todos los implementos, materiales y equipos necesarios se encontraban en la campana, sin embargo, cada línea celular se trabajó por separado, e inclusive los envases de descarte empleados son distintos para evitar contaminación celular y en ningún momento estuvieron

abiertos los contenedores de las líneas simultáneamente. El procedimiento seguido con las líneas celulares se describe en detalle a continuación.

LÍNEA 3T3**LÍNEA HT-29**

- Se temperó el medio nutritivo, la enzima tripsina y el PBS por cinco minutos en baño María.
- Se apagó la luz ultravioleta y se encendió el flujo de la campana.
- Se buscaron los elementos necesarios para llevar a cabo la siembra:
 - Bandeja de descarte.
 - Dos envases de descarte.
 - Ocho placas de 24 pozos.
 - Tubos de centrífuga.
 - Gasa.
 - Etanol al 70%.
 - Vasos de precipitado.
 - Frascos de Cultivo de las líneas celulares.
- Se procedió a hacer la esterilización de manos y objetos a ingresar en la campana, con etanol al 70%.
- Se descartó el medio nutritivo de cada frasco de cultivo en el envase destinado para tal fin.

LÍNEA 3T3

LÍNEA HT-29

- Se lavaron los frascos de cultivo tres veces con 3 mL de PBS, empleando pipetas diferentes en cada lavado y en cada línea celular.
- Se agregaron 2 mL de tripsina en cada frasco, se cerraron y se colocaron en la incubadora de CO₂ durante cinco minutos.
- Se agregaron 2 mL de medio nutritivo DMEM en cada frasco, se resuspendió el volumen y se traspasó la suspensión celular a dos tubos de centrifuga.
- Se colocaron ambos tubos en camisas de acero inoxidable y se equilibraron sus pesos en la balanza de dos platos, agregando para ello agua con un gotero en el espacio entre el tubo y la camisa.
- Se colocaron los tubos en la centrífuga, ubicándolos diametralmente opuestos, por cinco minutos a una velocidad de 2.500 rpm.
- Se descartó el medio nutritivo de cada tubo, en la Figura 5.13 se puede observar el taco celular sedimentado en el fondo de los tubos.



Figura 5.13: Fondo de los tubos de centrifuga donde se aprecia el taco celular, IBE.

LÍNEA 3T3	LÍNEA HT-29
<ul style="list-style-type: none"> Se resuspendieron en 5 mL de medio nutritivo DMEM. 	<ul style="list-style-type: none"> Se resuspendieron en 8 mL de medio nutritivo DMEM.
<ul style="list-style-type: none"> Se tomó una alícuota de 20 μL cada tubo y se colocó en dos cápsulas, luego se adicionó en cada cápsula azul de tripano y se resuspendió. 	
<ul style="list-style-type: none"> Se realizó el conteo celular al agregar la dilución preparada en la cámara Neubauer, chequeando al microscopio y promediando los valores obtenidos: 	

Lecturas	Promedio
18	24
22	
25	
31	

Lecturas	Promedio
174	194,5
215	
190	
199	

- Se determinó la densidad celular por mL de cada línea, de acuerdo a la ecuación 5.2.1, obteniendo:

$$D_c / mL = 4,8 \times 10^5$$

$$D_c / mL = 3,89 \times 10^6$$

- Originalmente se planeó sembrar a densidades de 20.000 células/pozo y 40.000 células/pozo, pero al hacer el conteo celular, la línea 3T3 no contaba con el número suficiente para hacerlo, por lo que se rediseñó la siembra a 20.000 células/pozo y 30.000 células/pozo.
- Se hizo el cálculo para tomar la alícuota necesaria de cada tubo para cubrir la siembra completa. Ver Apéndice C.

LÍNEA 3T3

- Se resuspendió el volumen del tubo y se tomaron 2 mL para la siembra de las placas de densidad 20.000 células/pozo y 3 mL para sembrar las placas de densidad 30.000 células/pozo.

LÍNEA HT-29

- Se resuspendió el volumen del tubo para tomar los 0,25 y 0,37 mL correspondientes a la siembra de las placas a las densidades de 20.000 células/pozo y 30.000 células/pozo, respectivamente. Sin embargo, durante la resuspensión la pipeta se obstruyó conteniendo 4 mL de la solución, por lo que se desechó y se realizó nuevamente el conteo celular de esta línea con el volumen remanente en el tubo de centrifuga (4 mL).
- Del nuevo conteo en la cámara de Neubauer tenemos:

Lecturas	Promedio
130	
128	
133	129
125	

- Nuevamente, se obtiene la densidad celular:

$$D_c / mL = 4,8 \times 10^5$$

LÍNEA 3T3	LÍNEA HT-29
<ul style="list-style-type: none"> Se tomaron 0,558 mL y 0,372 mL de suspensión celular para sembrar las placas a las densidades antes mencionadas. Se complementó con 21 mL y 22 mL de medio nutritivo DMEM en cada Beaker. 	<ul style="list-style-type: none"> Se complementó con 23,628 mL y 23,442 mL de medio nutritivo DMEM en cada beaker para la densidad de siembra menor y mayor respectivamente.

- Se resuspendió el volumen contenido en cada beaker antes de efectuar la siembra, se tomaron 500 μ L de medio y se sembraron en cada pozo, como se observa en las Figuras 5.14 y 5.15.

Se había planificado sembrar 1 mL por pozo, como se hizo en la fase de prueba, sin embargo, al disminuir el volumen de siembra celular es posible alcanzar dosis mayores con los mismos volúmenes de FDG.

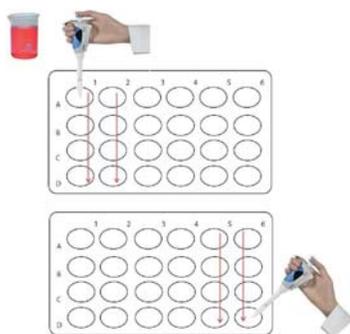


Figura 5.14: Primera Fase a densidad de 20.000 células/pozo

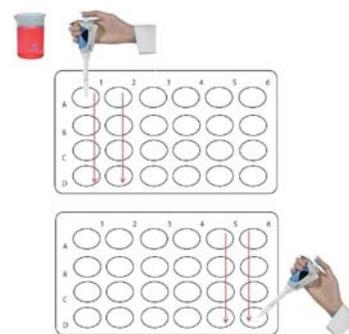


Figura 5.15: Primera Fase a densidad de 30.000 células/pozo

LÍNEA 3T3	LÍNEA HT-29
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Durante la siembra, a pesar de los cálculos, la solución preparada no alcanzó para todos los pozos (faltaron 12 de ambas densidades), debido a esto fue necesario preparar más solución para completar la siembra. ■ De los 4 mL que se tenían antes de iniciar la siembra ahora quedaban 3,07 mL, entonces, el número restante de células fue de 7,920,600. ■ Aunque faltaron 12 pozos por sembrar, se hizo el cálculo para 14 pozos. Se tomaron 109 y 163 μL de la suspensión celular y se completaron con 6,891 y 6,837 mL de medio nutritivo DMEM para obtener en ambos casos 7 mL. ■ Se prepararon ambas suspensiones celulares y se culminó la siembra.
<ul style="list-style-type: none"> ■ Se rotularon las ocho placas y se incubaron por 24 horas. ■ Se tomaron las cuatro placas sembradas a densidad de 30.000 células/pozo (2 placas de 3T3 y 2 placas de HT-29), se sellaron con parafilm, se envolvieron en papel de aluminio y se apilaron en la cava para su transporte al CDD. 	

LÍNEA 3T3	LÍNEA HT-29
-----------	-------------

- De manera paralela a este procedimiento llevado a cabo en el IBE, en el CDD el día de la siembra se midió la actividad necesaria para llevar a cabo la siembra de FDG a bajas dosis, según lo calculado previamente.



Figura 5.16: Reporte del Activímetro para la administración de bajas dosis.

- El día de traslado de las placas se midió la actividad para suministrar las dosis media-altas según lo planificado anteriormente. El reporte del activímetro se observa en la Figura 5.17.



Figura 5.17: Reporte del Activímetro para entregar las altas dosis.

- Antes de llevar a cabo la dosificación se diluyó el FDG hasta obtener 16 mL de solución para ambos casos:
 - 16 mL para el vial correspondiente a las bajas dosis.
 - 16 mL para el vial correspondiente a las dosis media-altas.

LÍNEA 3T3

LÍNEA HT-29

- Se suministraron las bajas dosis planificadas en ambas placas, como se ilustra en las Figuras 5.18 y 5.19, empleando para ello dos micropipetas Eppendorf® Series 2000: una de Volumen variable entre 50-200 μL y otra entre 100-1000 μL , de acuerdo a lo necesario para realizar la dosificación. Es importante destacar que en cada pozo una vez liberado el FDG, se resuspendió tres veces para asegurar la distribución uniforme del radiofármaco, esto implicó utilizar una punta diferente en cada pozo. Una vez efectuada la dosificación en la línea 3T3, se completó el remanente de radiofármaco hasta alcanzar nuevamente los 16 mL para poder manipular con mayor comodidad los volúmenes a administrar. Las puntas retiradas después de utilizarse, se desecharon dentro de la campana en un recipiente para dicho fin. Las placas no estuvieron abiertas simultáneamente bajo la campana para evitar contaminación celular.

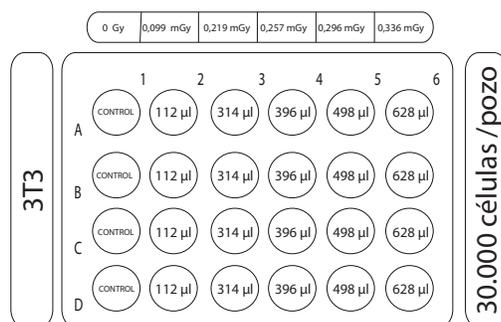


Figura 5.18: Línea 3T3 Irradiada a Bajas Dosis en la Primera fase.

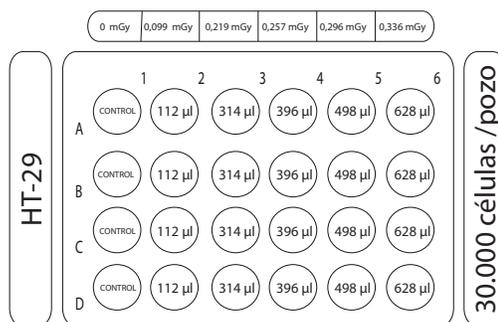
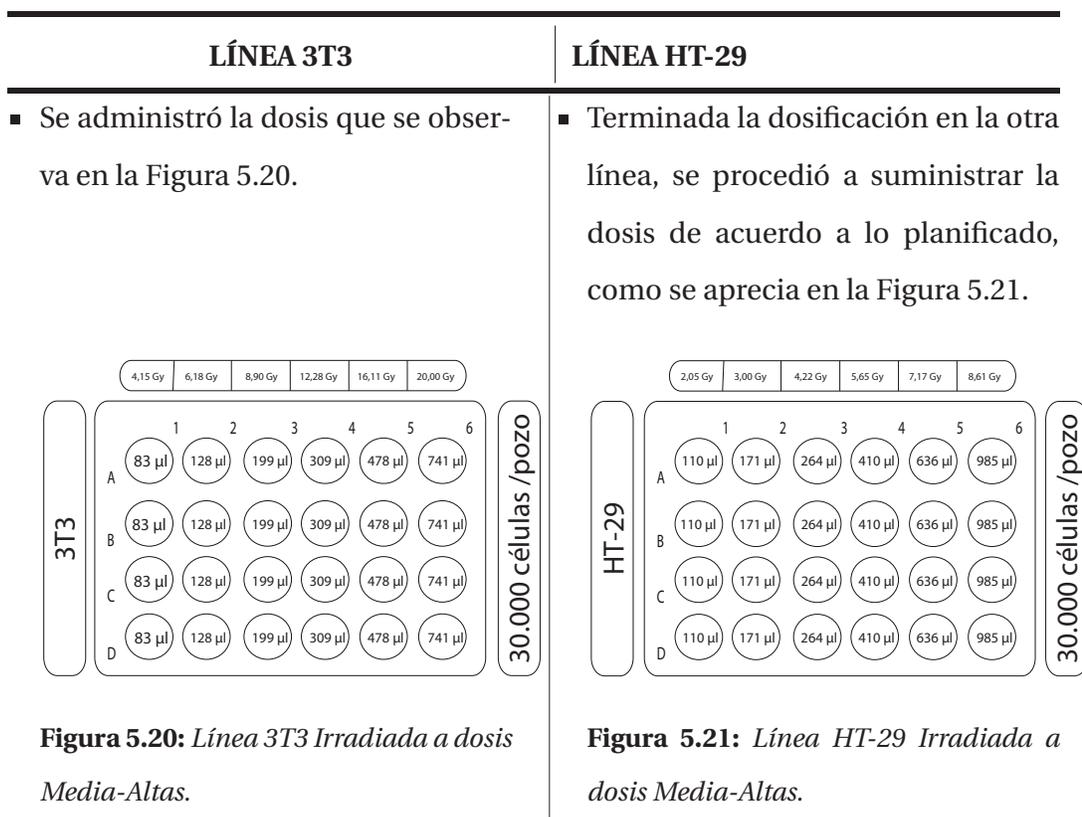


Figura 5.19: Línea HT-29 Irradiada a Bajas Dosis en la Primera Fase.

- Una vez suministradas las dosis, se cerraron las placas y se incubaron a 37°C.



- Se cerraron las placas y se colocaron en la incubadora a 37°C, donde permanecieron hasta el día siguiente.
- Se sellaron las placas con parafilm y se envolvieron en papel de aluminio para trasladarlas de nuevo al IBE apiladas en la cava.
- Se tomó registro fotográfico de las placas al llegar al IBE.
- De acuerdo al volumen de radiófarmaco agregado en cada pozo, se transfirió medio de cultivo a las placas sembradas a una densidad de 20.000 células/pozo (almacenadas en la incubadora del IBE), el esquema seguido se observa en las Figuras 5.22 y 5.23, y los pozos de las placas irradiadas fueron completados con nuevo medio nutritivo DMEM.

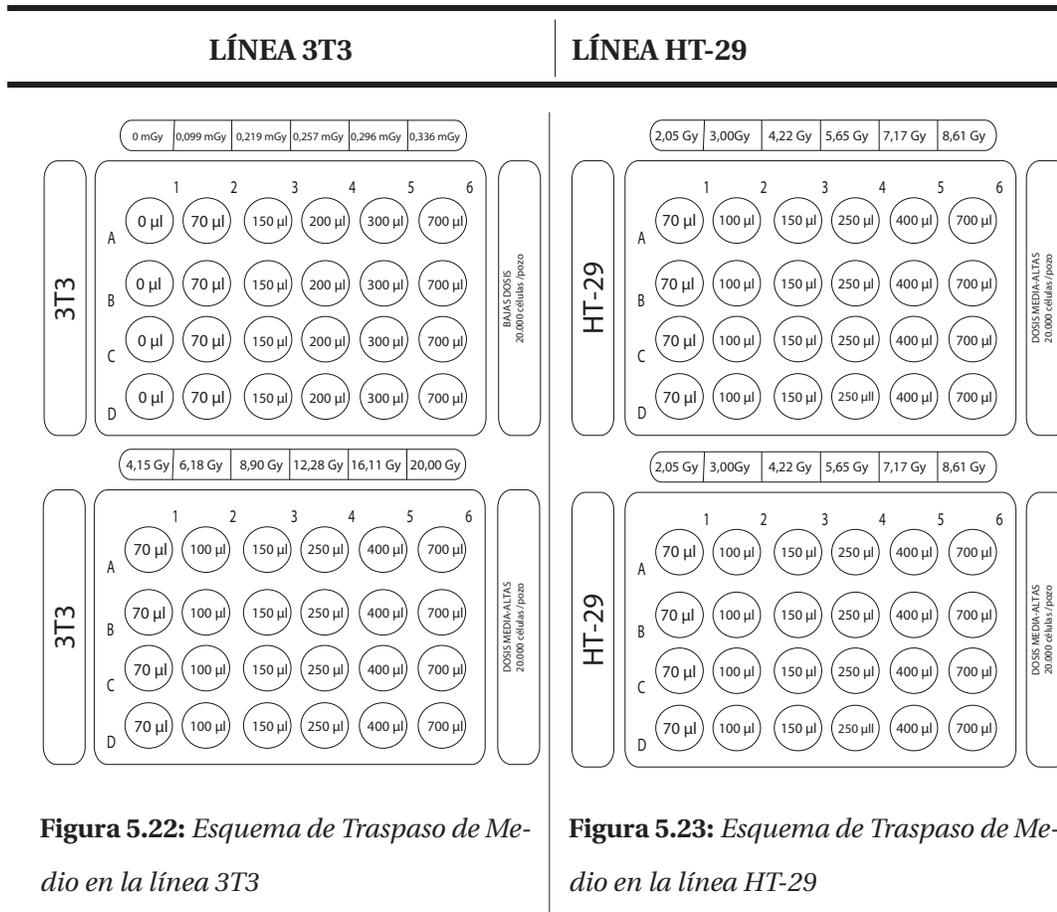


Figura 5.22: Esquema de Traspaso de Medio en la línea 3T3

Figura 5.23: Esquema de Traspaso de Medio en la línea HT-29

- El día posterior al traspaso de medio, se realizó el ensayo de MTT en las placas irradiadas en el CDD; las placas a las que se les traspasó medio permanecieron en la incubadora por tres días más (sábado, domingo y se detuvo el lunes).
- Para el procedimiento del ensayo de MTT ya no es necesario cuidar la asepsia y se trabaja fuera de la campana de flujo laminar, se procede como se describe a continuación:
 - Se descartó el medio de cultivo y se escurrieron las placas sobre toallín.

LÍNEA 3T3

LÍNEA HT-29

- Se prepararon 40 mL de solución de MTT al 0,4 mg/mL en solución de PBS. Para lo que se pesaron 0,016 g de MTT en una balanza y se mezclaron con 40 mL de solución de PBS. En la Figura 5.24 se puede observar el pesado de MTT en la balanza.



Figura 5.24: *Pesado de MTT en la balanza, IBE.*

- Se agregaron 250 μ L de solución de MTT en cada pozo.
- Se taparon las placas y se llevaron a la incubadora por dos horas.
- Se descartó el MTT de las placas y nuevamente se escurrieron las placas sobre toallín.
- Bajo una campana de extracción vertical se tomaron 40 mL de DMSO y se vertieron en un beaker para finalmente agregar en cada pozo 250 μ L.
- Se cerraron las placas, se envolvieron en papel de aluminio y se mantuvieron refrigeradas en la nevera.

LÍNEA 3T3

LÍNEA HT-29

- El día lunes se repitió el procedimiento del MTT con las placas no irradiadas.
- Las placas se llevaron al lector de Elisa del laboratorio de Patología Molecular del IVIC, ya que la altura de las placas no permitió que la bandeja pasara para efectuar la medición en el espectrofotómetro que se encuentra en el Laboratorio de Productos Naturales (Escuela de Química, UCV), mientras que el equipo del IVIC si tiene el acondicionamiento necesario para ellas, sin embargo, al intentar leerlas, arrojó un error que no pudo solucionarse y por esa razón se traspasó el sobrenadante de cada pozo (250 μ L) a dos placas de 96 pozos, que fueron leídas sin inconvenientes en el equipo.
- Se procesaron los resultados obtenidos.

5.2.3. Segunda Fase

Para esta última etapa se consideró repetir la serie de la primera fase y ampliar el rango de dosis en cada línea celular.

Una vez más, en base a lo experimentado en la fase anterior se ajustaron algunos detalles, entre ellos trabajar con las líneas celulares por separado a fin de minimizar variables, es decir, una semana se trabajaría con una de las líneas y en la siguiente oportunidad con la línea restante; también se modificó el tiempo a esperar luego de traspasar el medio de cultivo irradiado a las placas no irradiadas, la vista esquemática se observa en la Figura 5.25; sin embargo, se presentaron inconvenientes que impidieron que se llevara a cabo esta etapa por completo, entre ellos: proble-

mas de vacío en el ciclotrón prolongados por semanas, descarte por senescencia de la línea 3T3 y el más importante: el nivel de exposición alcanzado en la primera fase y la primera mitad de la segunda superó en cada oportunidad la dosis máxima diaria permitida para el POE; de no haber ocurrido esto se habrían solicitado más células de la línea 3T3 al IVIC para completar esta fase.



Figura 5.25: Esquema del procedimiento seguido en la segunda fase

Por los impedimentos mencionados anteriormente sólo se trabajó con la línea HT-29, la planificación de siembra se puede apreciar en la Figura 5.26.

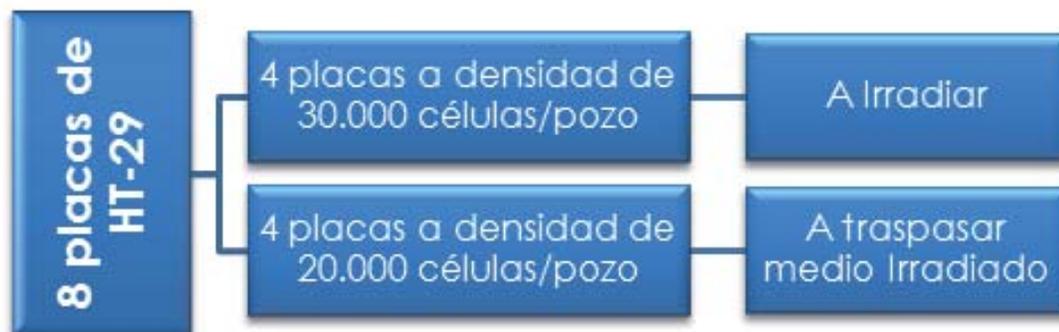


Figura 5.26: Esquema de Siembra para la Segunda Fase

Acá se describe el procedimiento seguido en esta última fase:

- Se temperó medio nutritivo DMEM, tripsina y PBS por cinco minutos.
- Se ubicó todo el material necesario para el trabajo de siembra:
 - Bandeja de descarte
 - Envase para descarte
 - Vasos de precipitado
 - Tubo de centrífuga
 - Pipetas graduadas
 - Pipeteador automático
 - Frasco de Etanol al 70% con rociador
 - Gasas
 - Frascos de cultivo contenedores de la línea HT-29

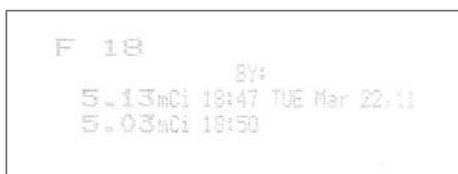
- Cápsula de Petri
- Placas de 6 x 4 pozos.
- La bandeja permanece afuera de manera tal que sea posible desechar en ella empaques y demás objetos no reusables.
- Antes de empezar a ingresar objetos a la campana se procedió a esterilizar las manos con etanol al 70 %.
- Posteriormente se desinfectaron las superficies de los materiales que se ingresaron en la campana, empleando etanol al 70 %.
- Se descartó el medio nutritivo de los frascos de cultivo que contenían HT-29.
- Se lavaron ambos frascos con 2,5 mL de PBS tres veces, empleando una pipeta graduada y el pipeteador automático.
- Se agregaron 2 mL de tripsina en cada frasco, se cerraron los frascos y se llevaron a la incubadora a 37°C por espacio de cinco minutos.
- Se verificó al microscopio invertido la disgregación celular y se procedió a inactivar la tripsina agregando 2 mL de medio nutritivo DMEM en cada frasco, se resuspendió en cada frasco el volumen de suspensión celular.
- Se tomaron los 8 mL de suspensión contenidos en los dos frascos y se colocaron en un tubo de centrifuga para luego colocarlo en la centrifuga durante cinco minutos.
- Se descartó el medio y se agregaron 2,5 mL de medio nutritivo al tubo, resuspendiendo el volumen al menos 6 veces para garantizar la homogeneización.

- Con una micropipeta se tomó una alícuota de 20 μL y se colocó en una cápsula de Petri, a este volumen se le adicionaron 20 μL de azul de tripano y se resuspendió para garantizar la distribución homogénea del colorante.
- Luego se llenó la cámara Neubauer con la dilución preparada, se contaron las células al microscopio y se promediaron las lecturas:

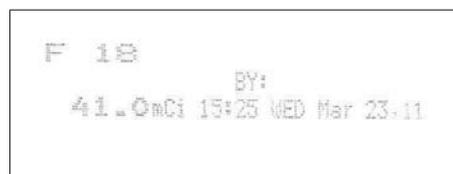
Lecturas	Promedio
79	
59	72,5
69	
83	

- Se calculó la densidad celular por mL, a partir de la relación expresada en la ecuación 5.2.1. Por el resultado obtenido fue necesario modificar el esquema de siembra y reducirlo a 2.000 y 3.000 células por pozo ya que el número de células totales presentes no alcanzarían para realizar esta fase como fue planeada inicialmente.
- Se determinaron las alícuotas a tomar para preparar las suspensiones a sembrar, aunque serían 4 placas para cada densidad, el cálculo se realizó en base a 5 placas. Ver Apéndice D.
- En dos beakers separados se preparó el volumen necesario para sembrar las ocho placas de esta fase según lo calculado previamente.
- Se procedió a sembrar 0,500 mL en cada pozo de acuerdo a lo planificado para cada densidad.
- Se cerraron las placas, se rotularon y se incubaron a 37°C hasta el día siguiente.

- Se sellaron con parafilm las cuatro placas de densidad 30.000 células/pozo, se envolvieron en papel de aluminio y se trasladaron al CDD.
- El día anterior se midieron 5 mCi de actividad para dejarlo decaer hasta la dosificación, de manera tal que se pudieran alcanzar las bajas dosis planificadas. Para las altas dosis, se midieron 41 mCi antes de dosificar. Los reportes del dosímetro se observan en la Figura 5.27.



(a) Reporte del Activímetro para entregar las bajas dosis



(b) Reporte del Activímetro para entregar las altas dosis

Figura 5.27: Reportes generados por el activímetro para la segunda fase

- El volumen de FDG para dosis altas se completó con solución salina hasta obtener 20 mL de solución y se procedió a dosificar bajo la campana de flujo laminar, empleando una punta de micropipeta para cada pozo y resuspendiendo tres veces el volumen para homogeneizar la distribución del radiofármaco. El esquema de dosificación se ilustra en la Figura 5.28. Se cerraron las placas y se llevaron a la incubadora hasta el día siguiente.

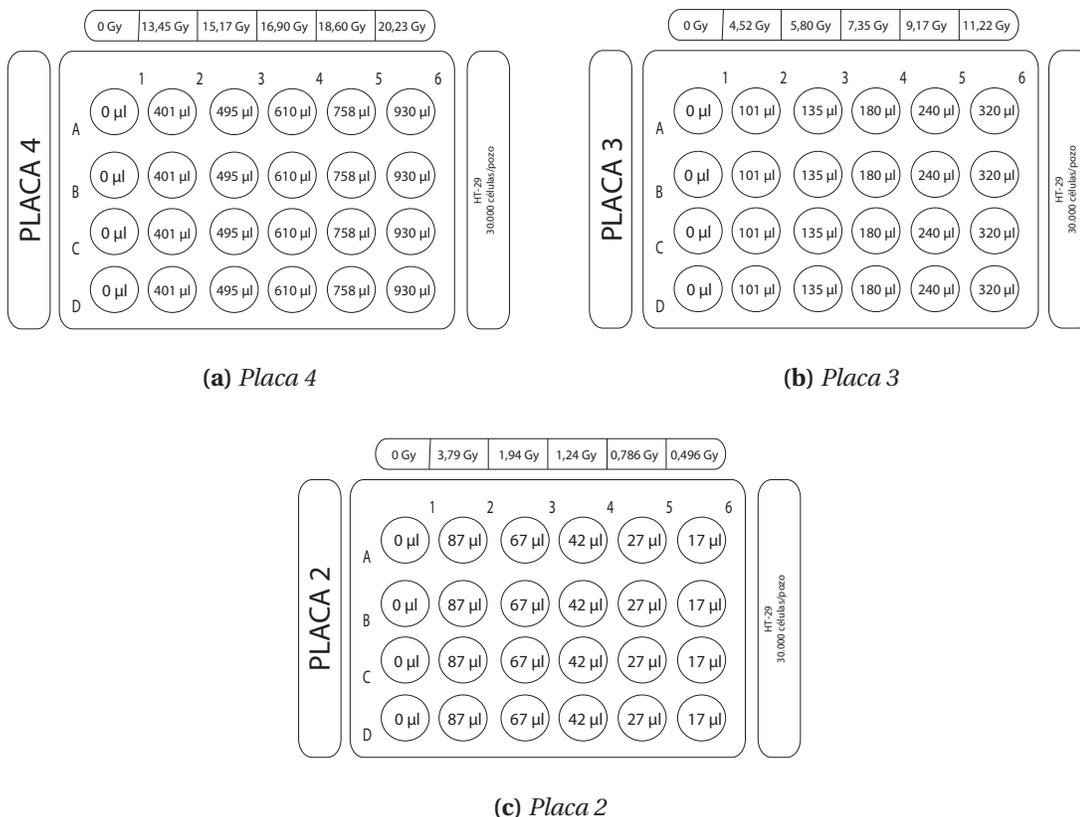


Figura 5.28: Placas de dosificación media-alta. Segunda Fase.

- Para llevar a cabo la entrega de bajas dosis, se diluyó el radiofármaco apartado el día anterior con solución salina hasta obtener 20 mL. De manera análoga a la mencionada anteriormente, se empleó una punta de micropipeta para cada pozo y se resuspendió tres veces el volumen. En la Figura 5.29 se observa el esquema seguido. Se cerró la placa y se llevó a la incubadora hasta el día siguiente.

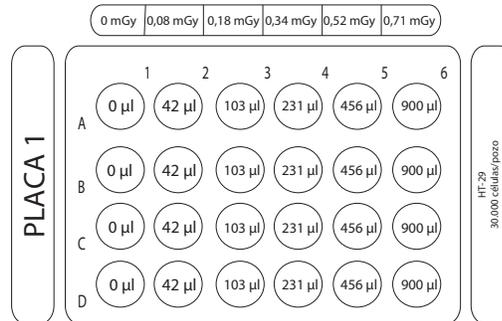


Figura 5.29: Placa de bajas dosis. Segunda fase.

- Para trasladar las placas de regreso al CDD, se sellaron con parafilm, se envolvieron en papel de aluminio y se apilaron en la cava.
- Una vez en el CDD se tomó registro fotográfico de los pozos.
- Se procedió a traspasar el medio irradiado a las placas sembradas a 2.000 células/pozo que permanecían en la incubadora del IBE. Para esto, una vez más se operó bajo la campana de flujo laminar a fin de garantizar la esterilidad necesaria. Los volúmenes traspasados son los mismos añadidos de FDG, como se observa en la Figura 5.30.

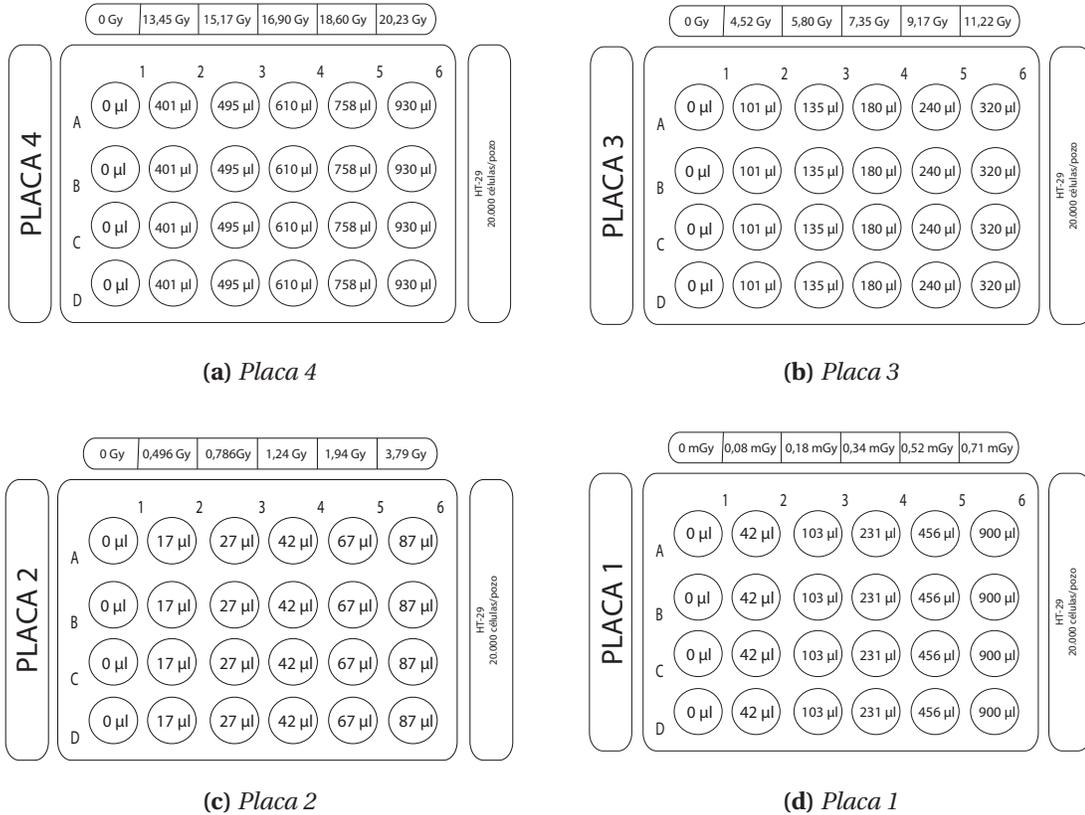


Figura 5.30: Esquema de volúmenes traspasados en la segunda fase.

- Se colocó medio nutritivo en las placas a las que se les extrajo. Se guardaron en la incubadora a 37°C.
- Pasadas 16 horas, se tomó registro fotográfico de las placas a las que se les traspasó el medio y se procedió a hacer el ensayo de MTT en las ocho placas.

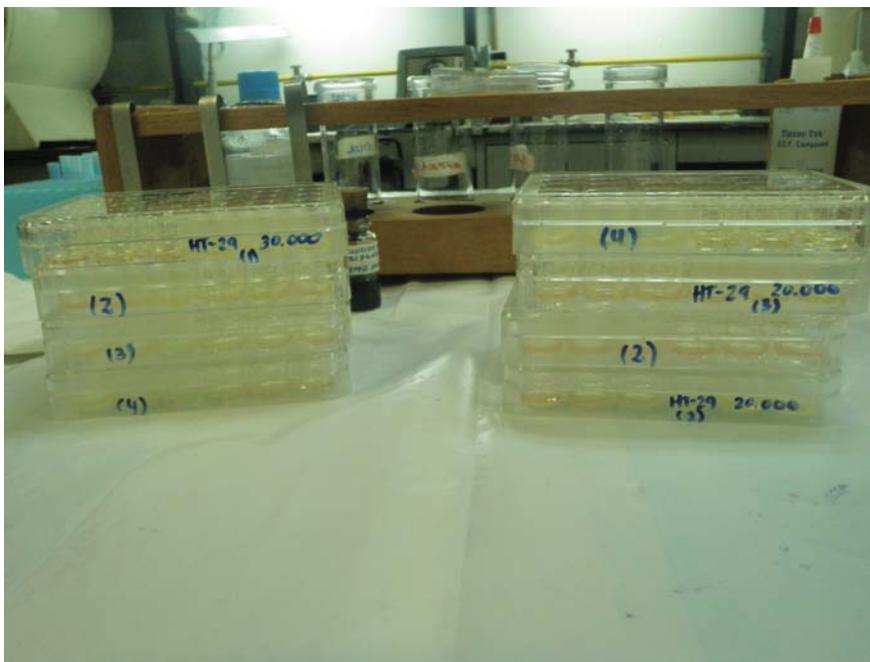


Figura 5.31: Las ocho placas de HT-29 empleadas en la segunda fase, sembradas a densidad de 3.000 células/pozo y 20.000 células/pozo a la izquierda y derecha respectivamente; ambos grupos con el MTT aplicado, IBE.

- Se leyeron las placas en el espectrofotómetro del laboratorio de productos Naturales.
- Se procesaron los resultados obtenidos.

5.2.4. FDG Decaído

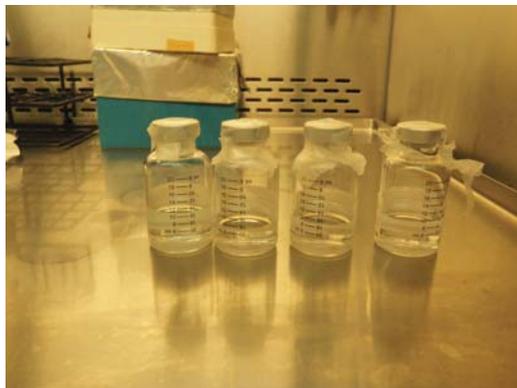
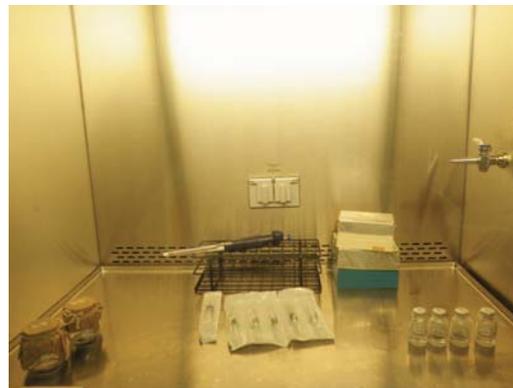
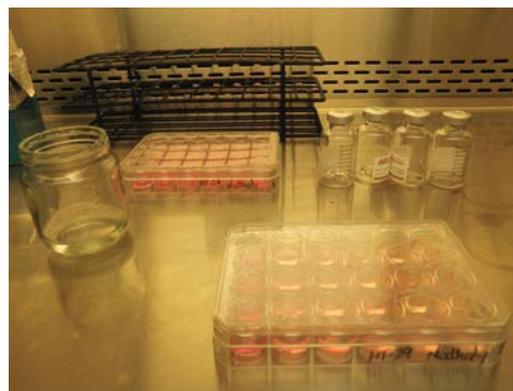
En esta última serie de experimentos se trabajó con excedentes de FDG totalmente decaído, con la finalidad de determinar si este influye en el crecimiento de la población celular de la línea HT-29. Para ello se emplearon excedentes de cua-

tro producciones, que fueron retirados del CDD en cuatro viales. A continuación se explica el procedimiento seguido.

- Se buscaron los materiales a emplear para la siembra, como en los procedimientos anteriores. Se higienizaron con etanol al 70 % antes de ingresarlos a la campana.
- Se descartó el medio nutritivo de los dos frascos de cultivo, se lavaron tres veces con 2 mL de PBS.
- Se agregaron 3 mL de tripsina en cada frasco y se llevaron a la incubadora por espacio de 5 minutos. Transcurrido este tiempo se verificó la disgregación celular al microscopio invertido para luego agregar 2 mL de medio nutritivo en cada frasco inactivando de esta manera la tripsina.
- Se resuspendieron los 5mL de suspensión celular en cada frasco, se trasvasaron a dos tubos de centrífuga, se cerraron los tubos y se colocaron en la centrífuga por cinco minutos.
- Se descartó el sobrenadante de los tubos, se agregó 1 y 1,5 mL de medio nutritivo en cada tubo, se resuspendió y se colocó todo en uno de los tubos, resuspendiendo varias veces los 3,5 mL totales de suspensión.
- Se tomó una alícuota de 20 μL de la suspensión celular y una alícuota de 20 μL de azul de tripano y se colocaron en una cápsula de Petri. Se mezcló el colorante con la suspensión celular y se colocó en la cámara de Neubauer para realizar el conteo celular, obteniendo los siguientes resultados:

Lecturas	Promedio
26	
23	
27	25,75
28	

- De esta manera, sabemos que la densidad celular presente por mL era de $5,15 \times 10^5$, por lo tanto en 3,5 mL de suspensión se tenían 1.802.500 células.
- Se planificó la siembra en base a 60 pozos, para una siembra de 30.000 células por pozo. Para esto se colocaron en un beaker 3,5 mL de células en suspensión y se les agregó 26,5 mL de medio nutritivo y se resuspendió varias veces antes de iniciar la siembra.
- Se procedió a sembrar 500 μL de esta nueva suspensión celular en cada pozo.
- Se cerraron las placas, se rotularon y se colocaron en la incubadora a 37 °C hasta el siguiente día.
- Se tomaron los volúmenes de cada vial, empleando para ello inyectadoras estériles y se colocaron en un recipiente estéril; de esta manera se mezclaron 8; 9,6; 8 y 7 mL de los cuatro viales para obtener un volumen total de 32,6 mL de FDG decaído.

(a) *Viales*(b) *Equipamento*(c) *Extracción de FDG de los Viales*(d) *Placas a dosificar***Figura 5.32:** *Dosificación del FDG decaído, IBE.*

- Empleando una micropipeta de volumen variable y una punta para cada pozo,

se distribuyeron las dosis como se muestra en la Figura 5.33. Para asegurar una distribución homogénea del fármaco se resuspendió tres veces en cada pozo.

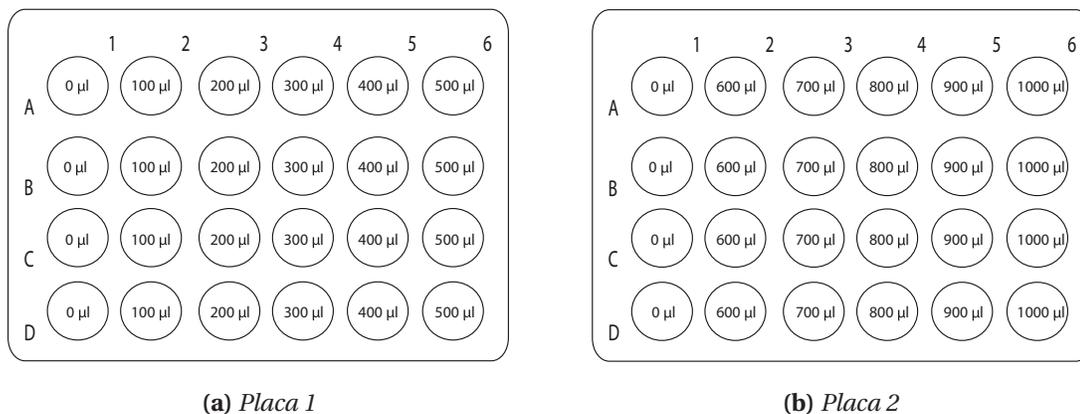


Figura 5.33: Dosificación del FDG decaído

- Se cerraron las placas y se llevaron a la incubadora a 37°C donde permanecieron por 23 horas.
- Se realizó el ensayo de MTT.
- Se leyeron las placas en el espectrofotómetro.
- Se procesaron los resultados obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Fase de Prueba

Esta etapa posee resultados netamente cualitativos, ya que se desarrolló para evaluar el protocolo que se seguiría en los experimentos posteriores.

La exposición durante las entregas de dosis constituye un factor importante a considerar, por ello a continuación se presentan los valores de exposición leídos de los dosímetros personales tanto para el operador como para el asistente (tesista), como resultado de la dosificación realizada en esta etapa:

Exposición (mRem)	
Operador	3,7
Asistente	1,0

Tabla 6.1: *Valores de exposición durante la fase de prueba*

En esta Fase se tomó registro fotográfico en las siguientes oportunidades:

- Antes de llevar las placas al CDD para su irradiación,

- En las 4 horas posteriores a la irradiación (Figura 6.1),
- Al fijar y colorear las placas.

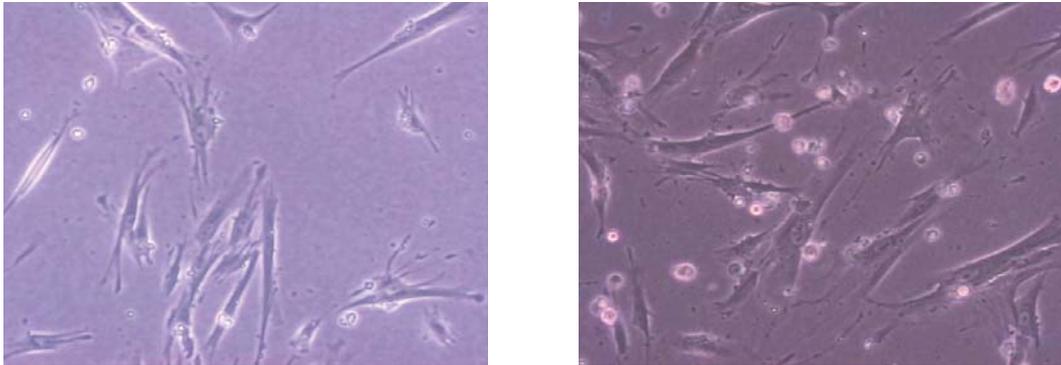


Figura 6.1: Registro inicial de la línea 3T3 (4x), antes de trasladarlas para su irradiación.

La serie de imágenes que siguen corresponden a las tomadas en las 4 horas luego de la irradiación.

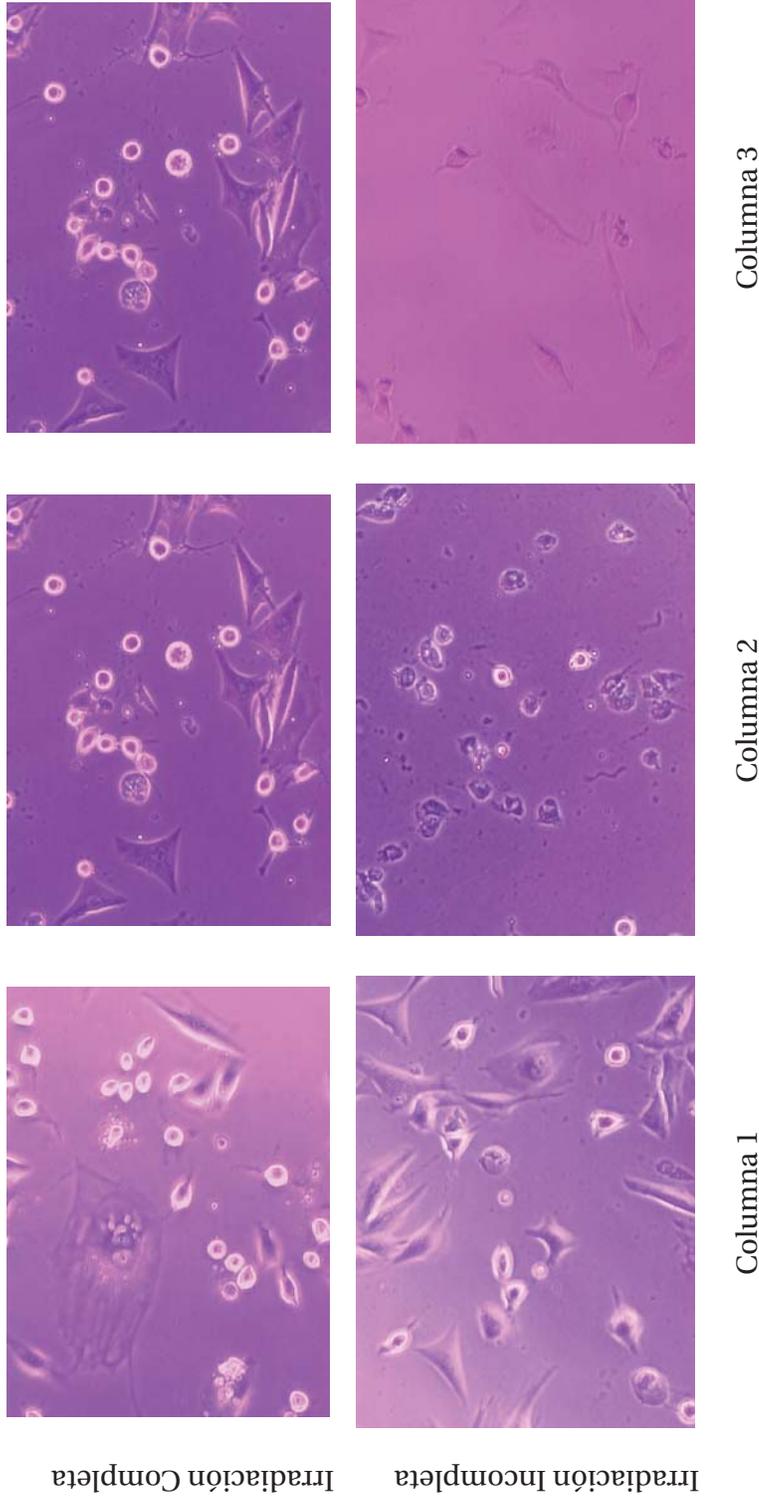


Figura 6.2: Primeras tres columnas observadas al microscopio invertido(4x) en ambas placas de la fase de prueba. Registro tomado cuatro horas después de la irradiación

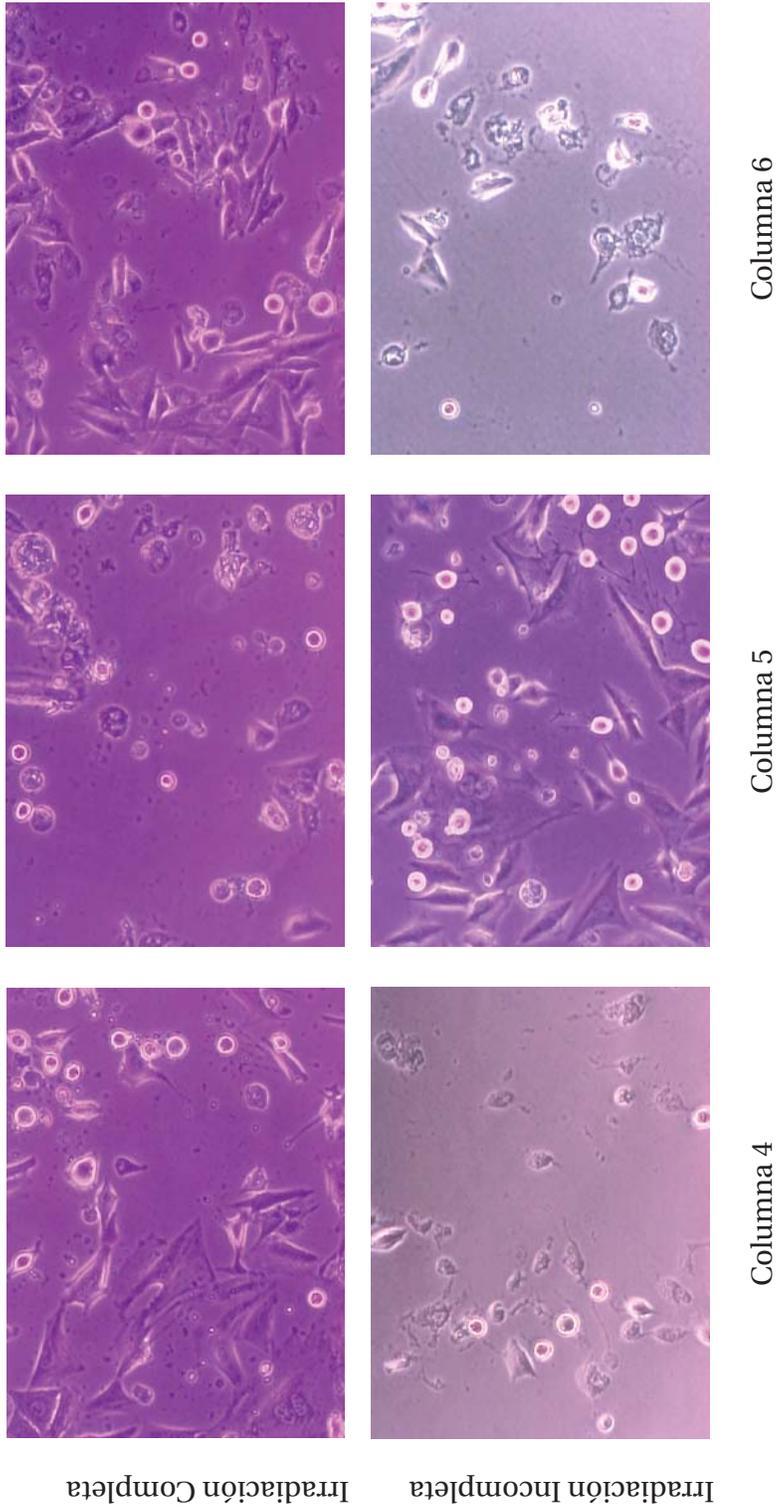


Figura 6.3: Últimas tres columnas observadas al microscopio invertido(4x) en ambas placas de la fase de prueba. Registro tomado cuatro horas después de la irradiación

En esta primera observación que se hace luego de la irradiación, presentada en las figuras 6.2 y 6.3, podemos visualizar que las columnas no irradiadas no presentan daños en comparación con las columnas que sí lo fueron por lo que se tomó la decisión de hacer los siguientes experimentos irradiando todos los pozos de las placas, exceptuando los controles.

Al analizar ambas placas al microscopio, se pudo notar que el efecto era mayormente en el área central del pozo, es decir, donde se dejó caer el FDG. Mientras que en la periferia no se observaron daños similares para el momento en el que se tomó el registro. Para ilustrarlo, tenemos en la figura 6.4 una imagen correspondiente a una dosis de 4,1 Gy en la placa irradiada a columnas intercaladas.

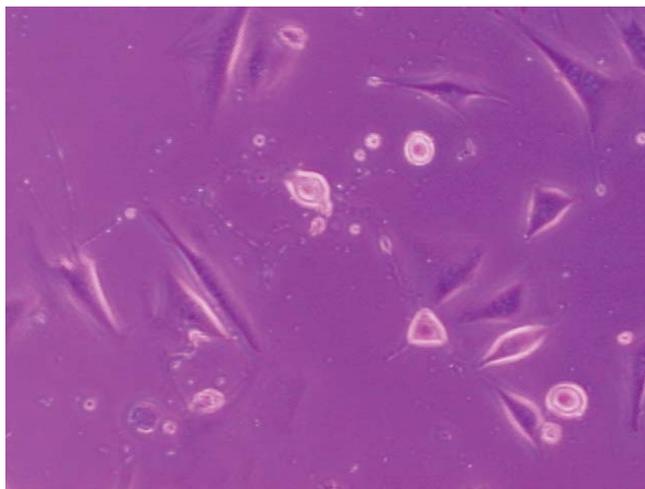
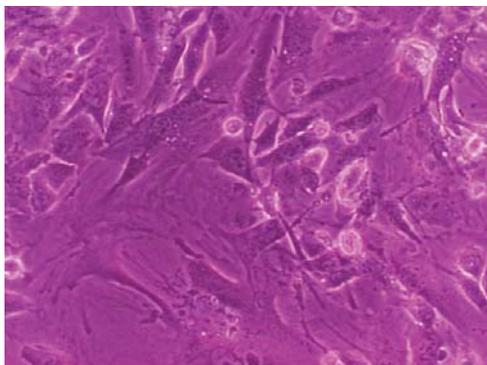
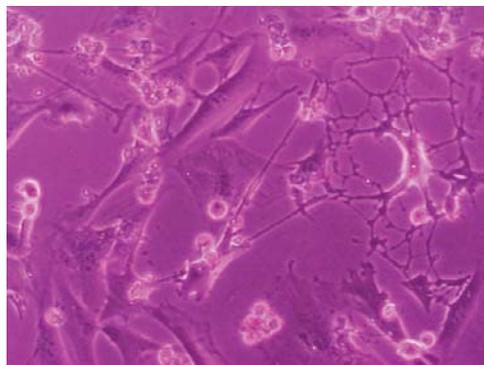


Figura 6.4: *Periferia Incompleta columna 6 (4,1 Gy), 4x*

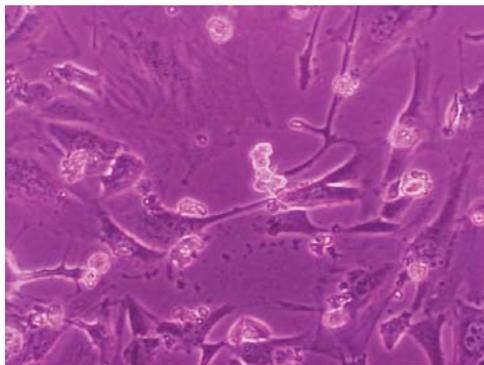
Por otra parte, tenemos que este registro se tomó un día viernes como se mencionó anteriormente en la metodología y por esta razón no se pudo hacer seguimiento a las placas en las 24 horas posteriores a la irradiación.



(a) Segunda Columna (1,93 Gy)



(b) Cuarta Columna (2,89 Gy)



(c) Sexta Columna (3,73 Gy)

Figura 6.5: Imágenes tomadas antes de hacer la fijación de las placas en la irradiada a columnas intercaladas, con un aumento de 10x

El lunes se procedió a fijar y colorear las placas sin embargo, por diferentes circunstancias que se presentaron, el registro fotográfico se tomó después de haber realizado los experimentos con glucosa, las placas una vez fijadas y coloreadas pueden ser observadas al microscopio en cualquier momento sin problema, sólo se necesita agregar agua en los pozos.

6.1.1. Placa Completa

A continuación se muestran imágenes tomadas de la placa completamente irradiada. Podemos notar que desde la menor dosis que se entregó se observan daños, tal y como se aprecia en las figuras 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 6.10 y 6.11.

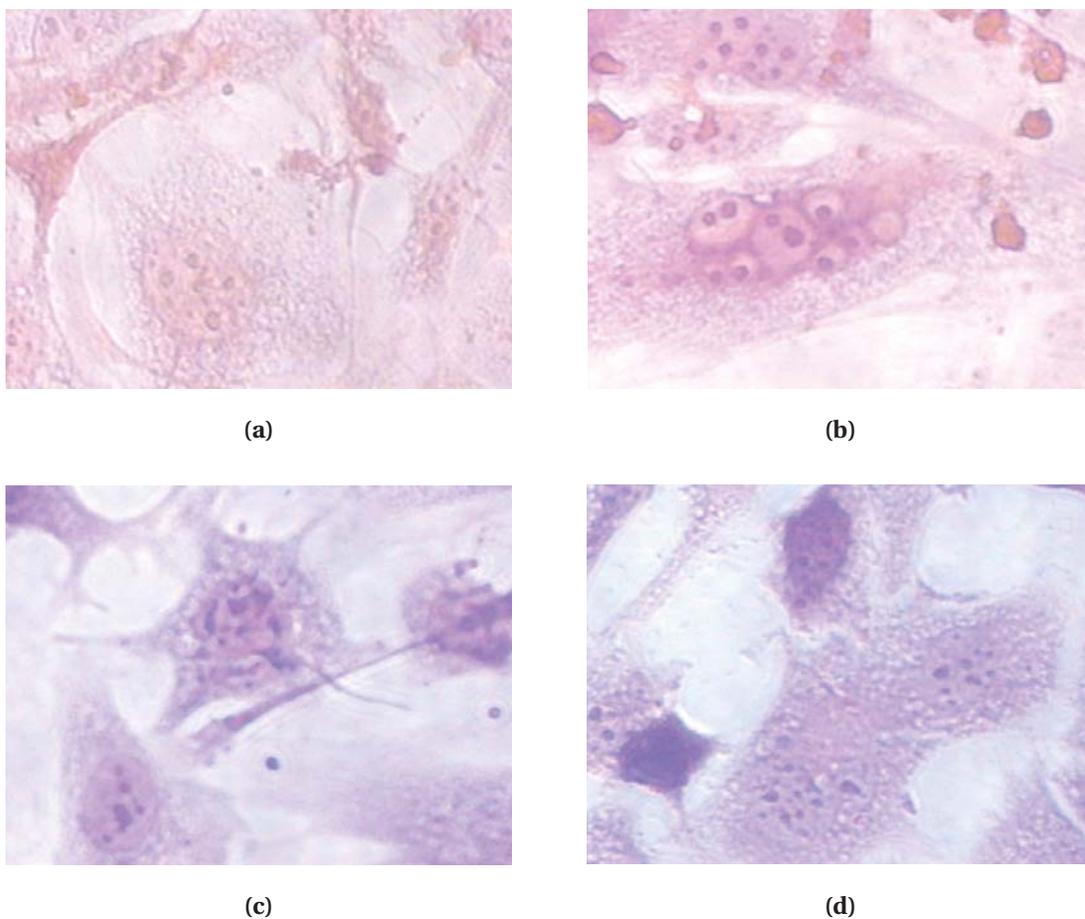


Figura 6.6: *Imágenes correspondientes a la primera columna (Dosis de 1,41 Gy) en la placa completamente irradiada observadas al microscopio invertido(40x).*

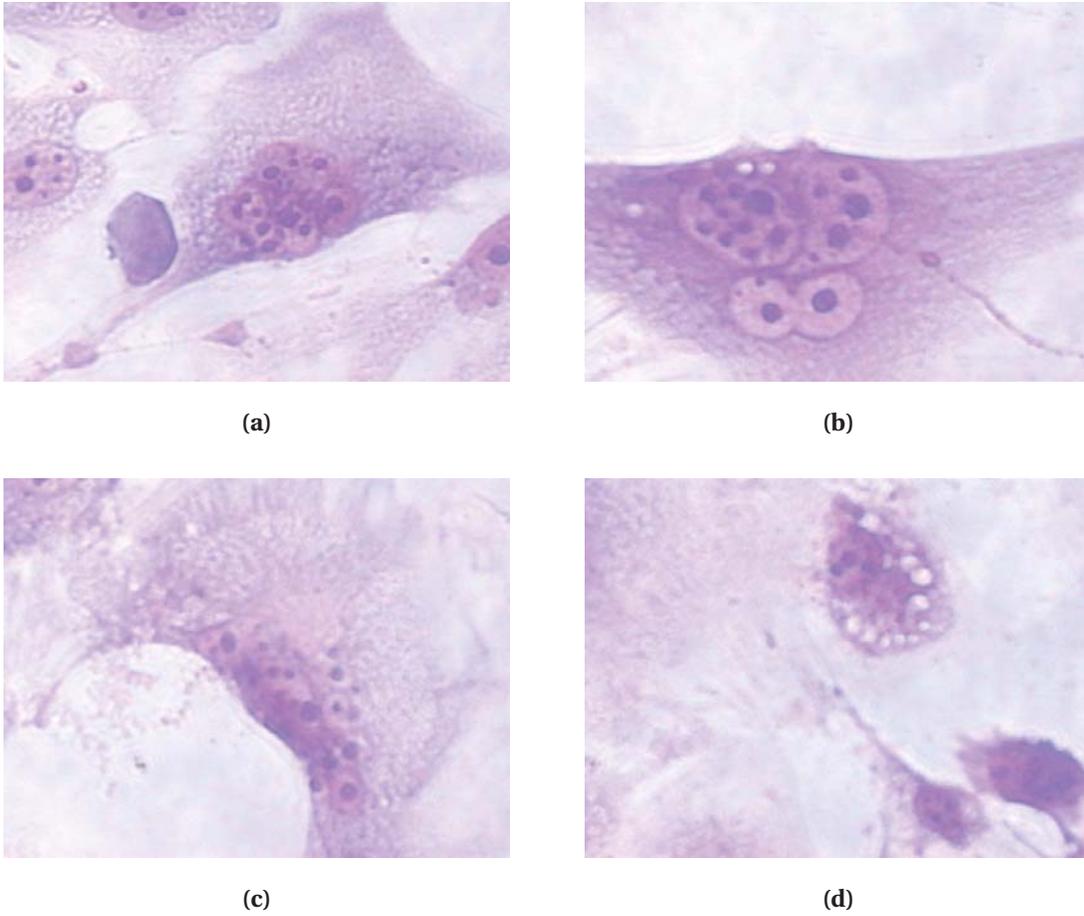
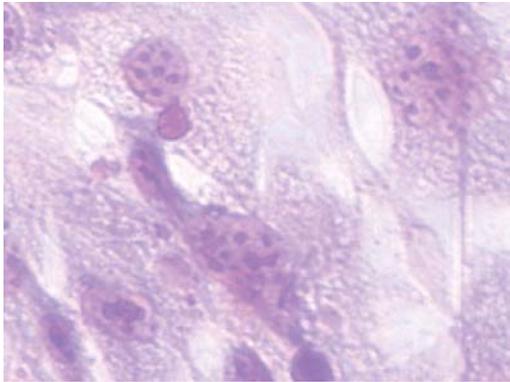
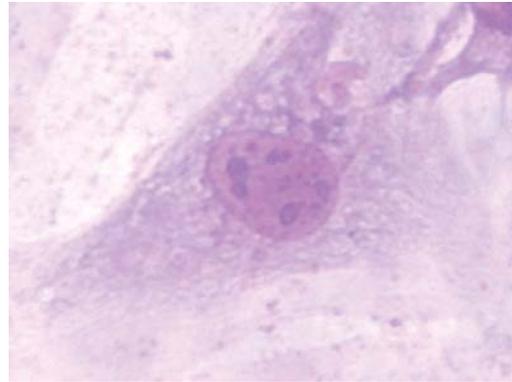


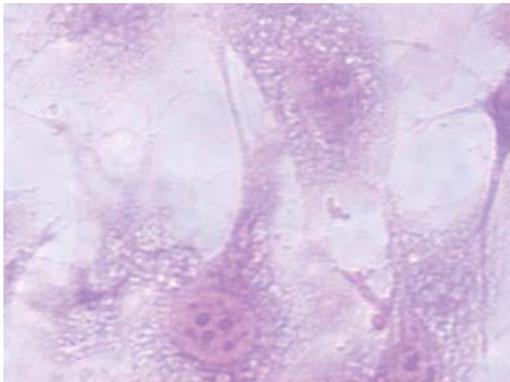
Figura 6.7: *Imágenes correspondientes a la segunda columna (Dosis de 1,93 Gy) en la placa completamente irradiada observadas al microscopio invertido(40x).*



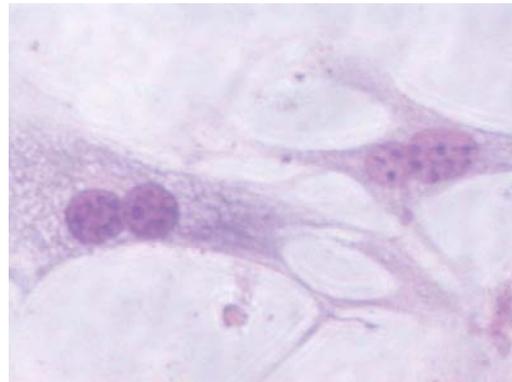
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 6.8: *Imágenes correspondientes a la tercera columna (Dosis de 2,43 Gy) en la placa completamente irradiada observadas al microscopio invertido(40x).*

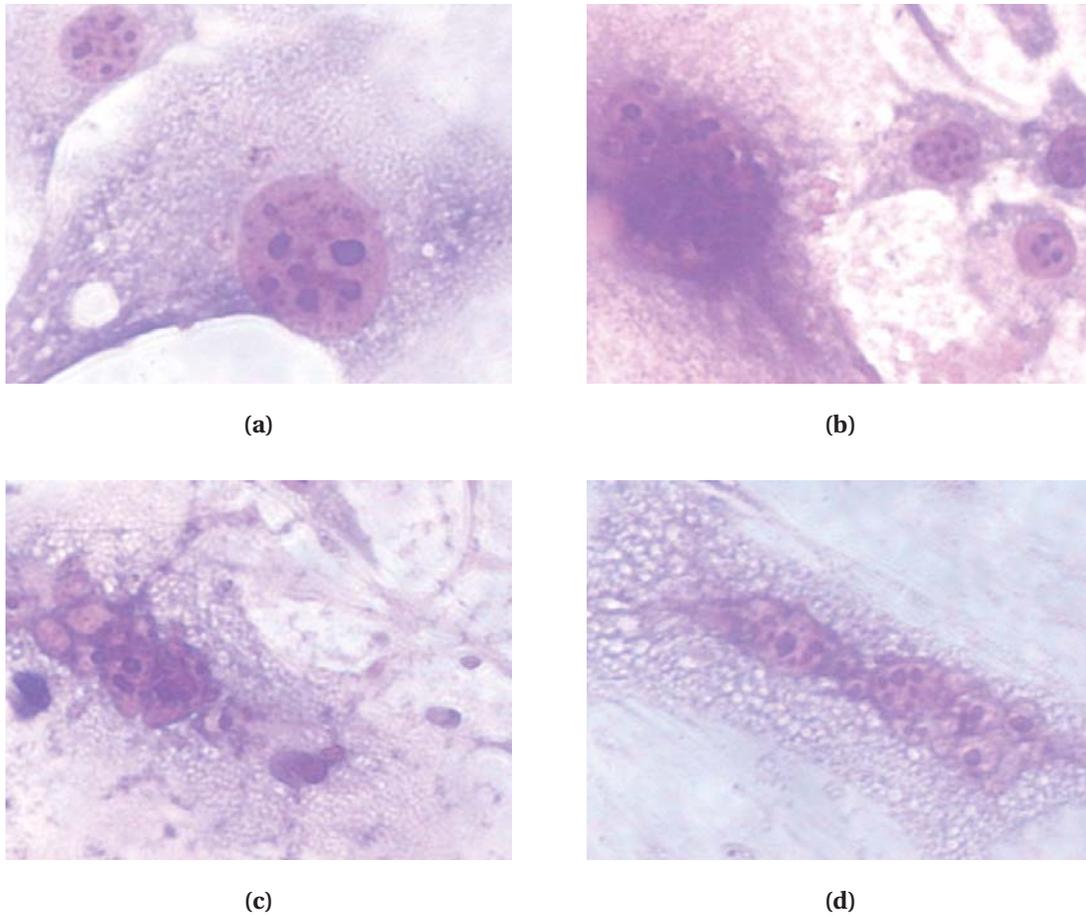


Figura 6.9: *Imágenes correspondientes a la cuarta columna (Dosis de 2,89 Gy) en la placa completamente irradiada observadas al microscopio invertido(40x).*

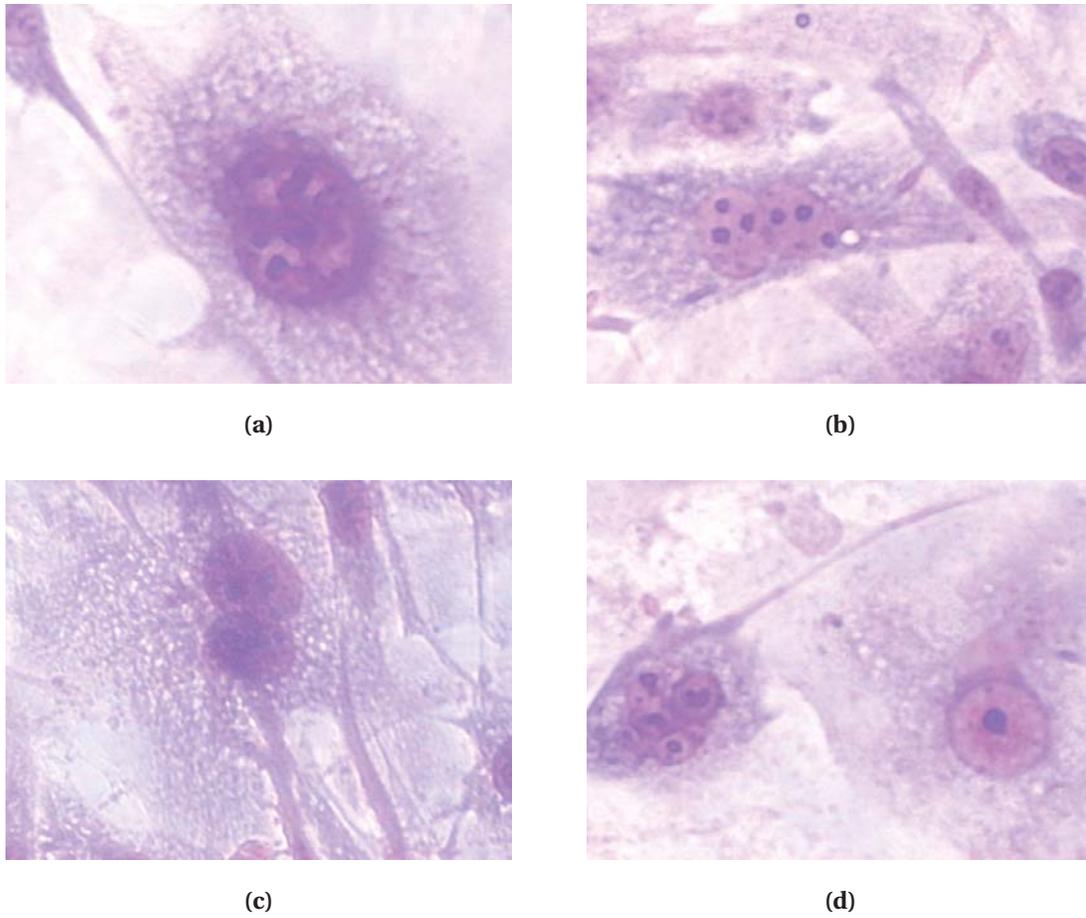


Figura 6.10: *Imágenes correspondientes a la quinta columna (Dosis de 3,33 Gy) en la placa completamente irradiada observadas al microscopio invertido(40x).*

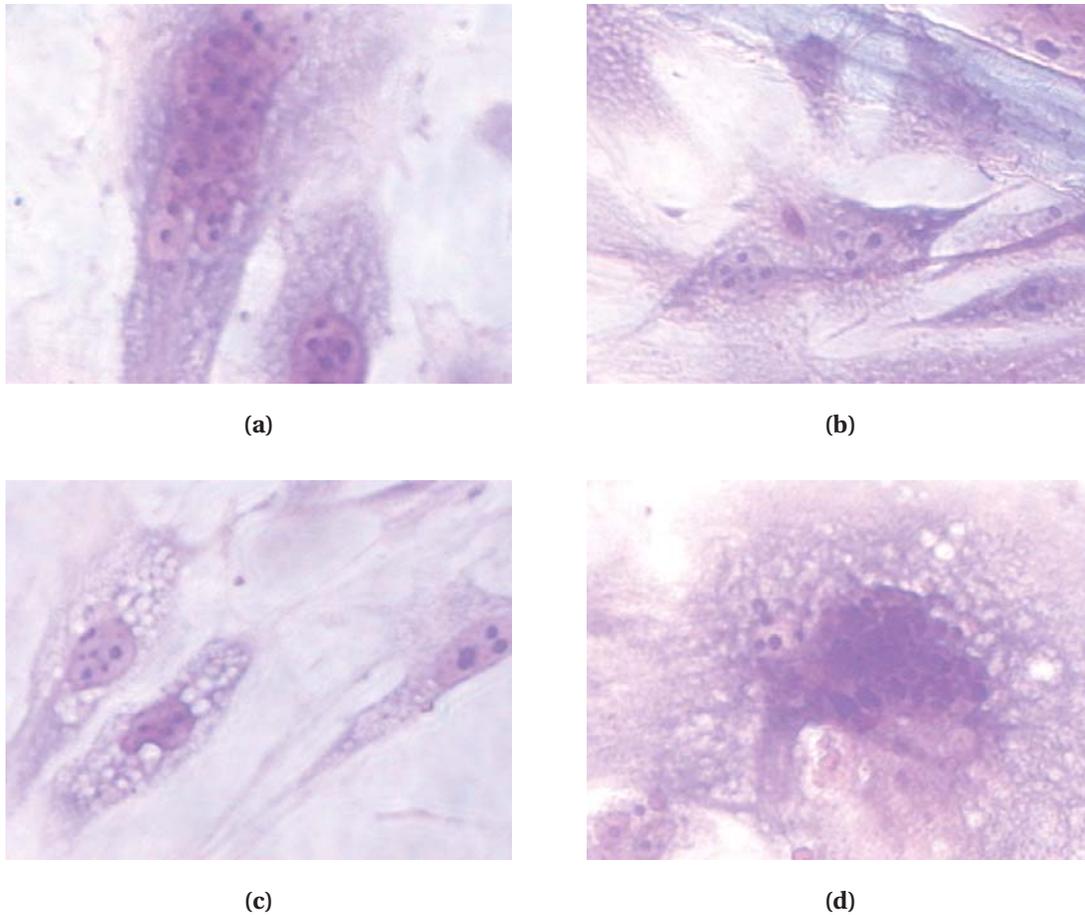


Figura 6.11: *Imágenes correspondientes a la sexta columna (Dosis de 3,73 Gy) en la placa completamente irradiada observadas al microscopio invertido(40x).*

6.1.2. Placa Incompleta

Las figuras 6.12, 6.13 y 6.14 corresponden a las columnas no irradiadas y a diferencia del primer registro que se tomó podemos notar que se produjo daño celular similar al observado en las otras columnas de la placa, aunque en menor

proporción ya que el número de células presentes en estas columnas era mayor al observado en las columnas irradiadas para cuando se realizó el primer registro, otro elemento observado al microscopio es que en las 72 horas posteriores la población de las células irradiadas aumentó mientras que las columnas no irradiadas se mantuvieron sin cambio estimado en ese aspecto, es decir, de alguna manera su capacidad reproductiva se vio afectada.

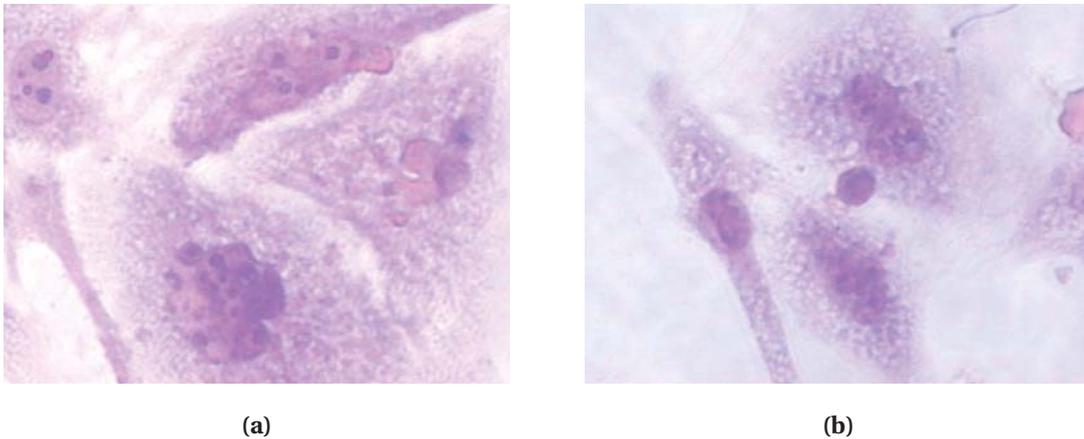


Figura 6.12: *Imágenes correspondientes a la primera columna (Dosis de 0 Gy) en la placa irradiada a intercolumnas observadas al microscopio invertido(40x).*

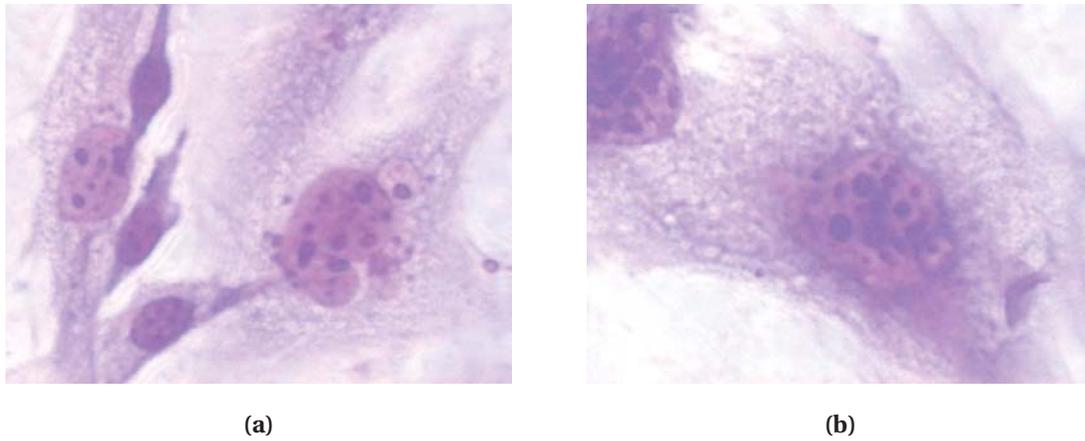


Figura 6.13: *Imágenes correspondientes a la segunda columna (Dosis de 1,93 Gy) en la placa irradiada a intercolumnas observadas al microscopio invertido(40x).*

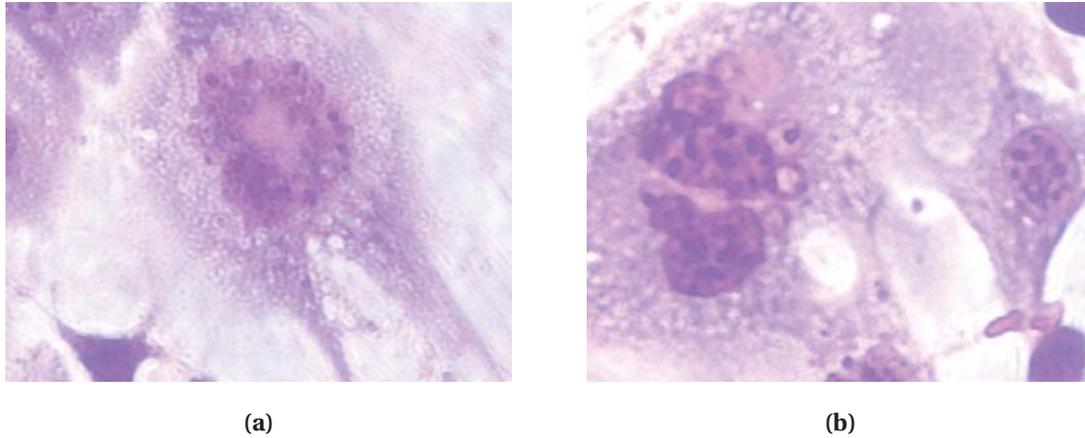


Figura 6.14: *Imágenes correspondientes a la tercera columna (Dosis de 0 Gy) en la placa irradiada a intercolumnas observadas al microscopio invertido(40x).*

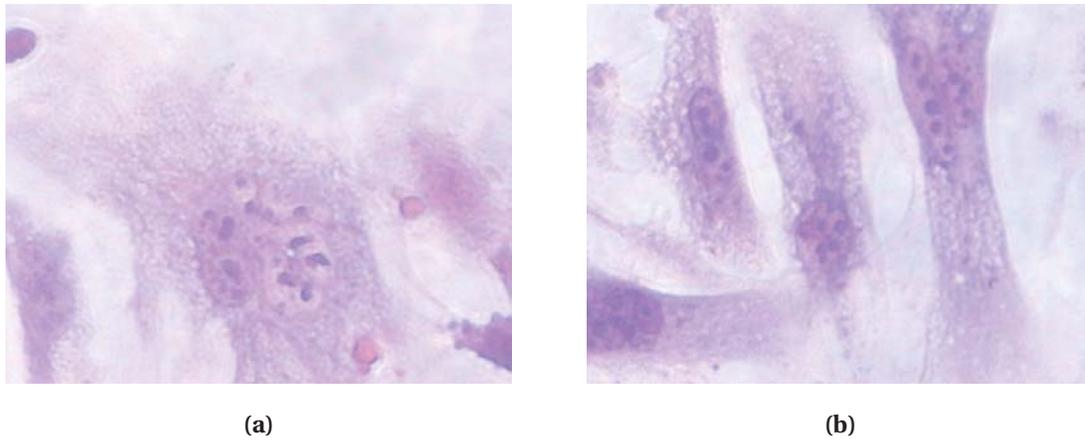


Figura 6.15: *Imágenes correspondientes a la cuarta columna (Dosis de 2,89 Gy) en la placa irradiada a intercolumnas observadas al microscopio invertido(40x).*

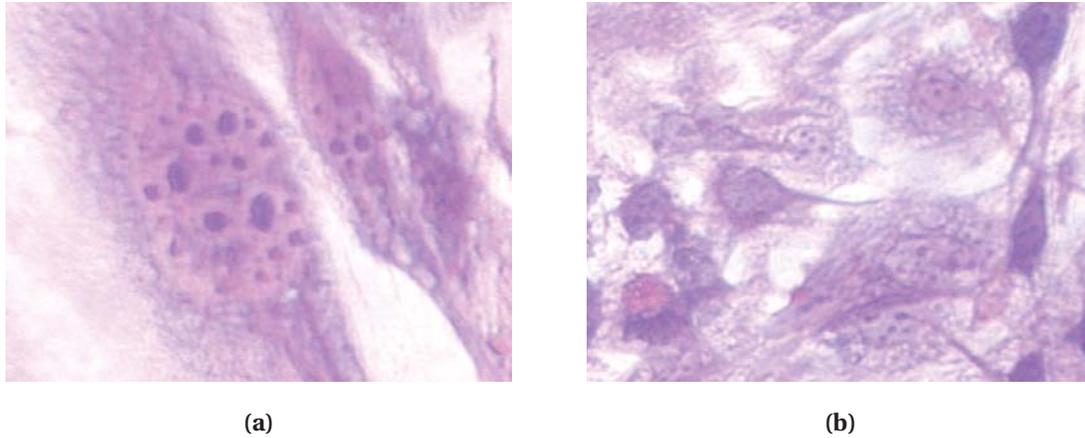


Figura 6.16: *Imágenes correspondientes a la quinta columna (Dosis de 0 Gy) en la placa irradiada a intercolumnas observadas al microscopio invertido(40x).*

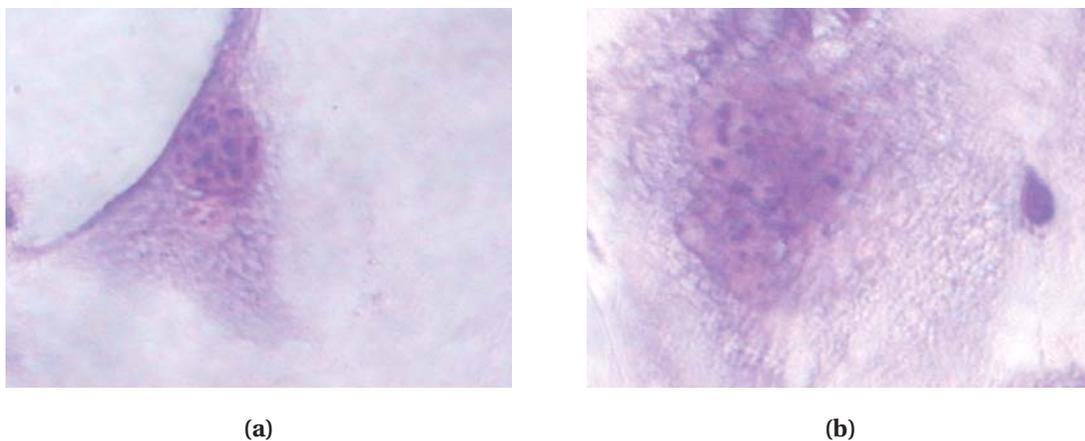


Figura 6.17: *Imágenes correspondientes a la sexta columna (Dosis de 3,73 Gy) en la placa irradiada a intercolumnas observadas al microscopio invertido(40x).*

Esta etapa a través de la coloración efectuada permitió apreciar con mayor detalle los cambios y alteraciones experimentados por las células al ser sometidas a radiación ionizante.

De manera general apreciamos que el nucleolo se fragmentó, efecto que se incrementa con la dosis al igual que la elevada formación de vacuolas, hecho que nos hace pensar en la posibilidad de estar ante la presencia de la autofagia como mecanismo de muerte celular. Sin embargo, no podemos dar certeza de ella mediante simple observación a través del microscopio, para evaluar mecanismos de muerte celular tales como autofagia o apoptosis se emplean “kits” específicos a través de los cuales se añaden algunos reactivos a las placas y permiten cuantificar ciertas proteínas presentes dentro de las vesículas formadas en las células así como otros indicadores de dichos mecanismos.

6.2. Primera Fase

Los resultados se presentan cualitativa y cuantitativamente, los primeros corresponden a las imágenes tomadas a través del microscopio invertido y los segundos a las lecturas realizadas en el espectrofotómetro.

Los resultados cuantitativos como variante de la anterior etapa constituyen una herramienta importante para observar en números reales que está sucediendo con los cultivos celulares tanto en las placas irradiadas como en aquellas a las cuales se les traspasó el medio irradiado.

El registro fotográfico se efectuó:

- Antes de llevar las placas al CDD para su irradiación.
- En las 24 horas posteriores a la irradiación
- En las 96 horas posteriores al traspaso de medio.



(a) *Células de la línea 3T3*



(b) *Células de la línea HT-29*

Figura 6.18: Registro de las líneas antes de irradiarlas (4x).

Para esta etapa se obtuvieron los siguientes valores de exposición:

Exposición (mRem)	
Operador	8,2
Asistente	1,4

Tabla 6.2: Valores de exposición durante la primera fase.

6.2.1. Línea 3T3

Placas Irradiadas

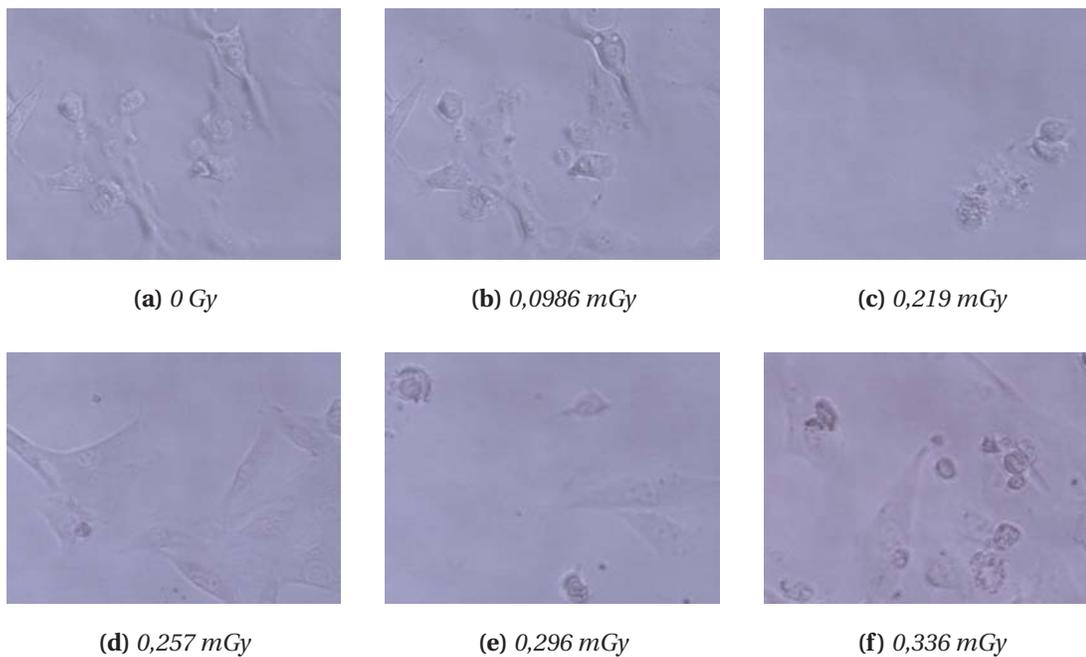


Figura 6.19: Imágenes correspondientes la placa de la línea 3T3 irradiada a bajas dosis observadas al microscopio invertido(4x).

Al microscopio no se observaron cambios a nivel celular en comparación con la columna control.

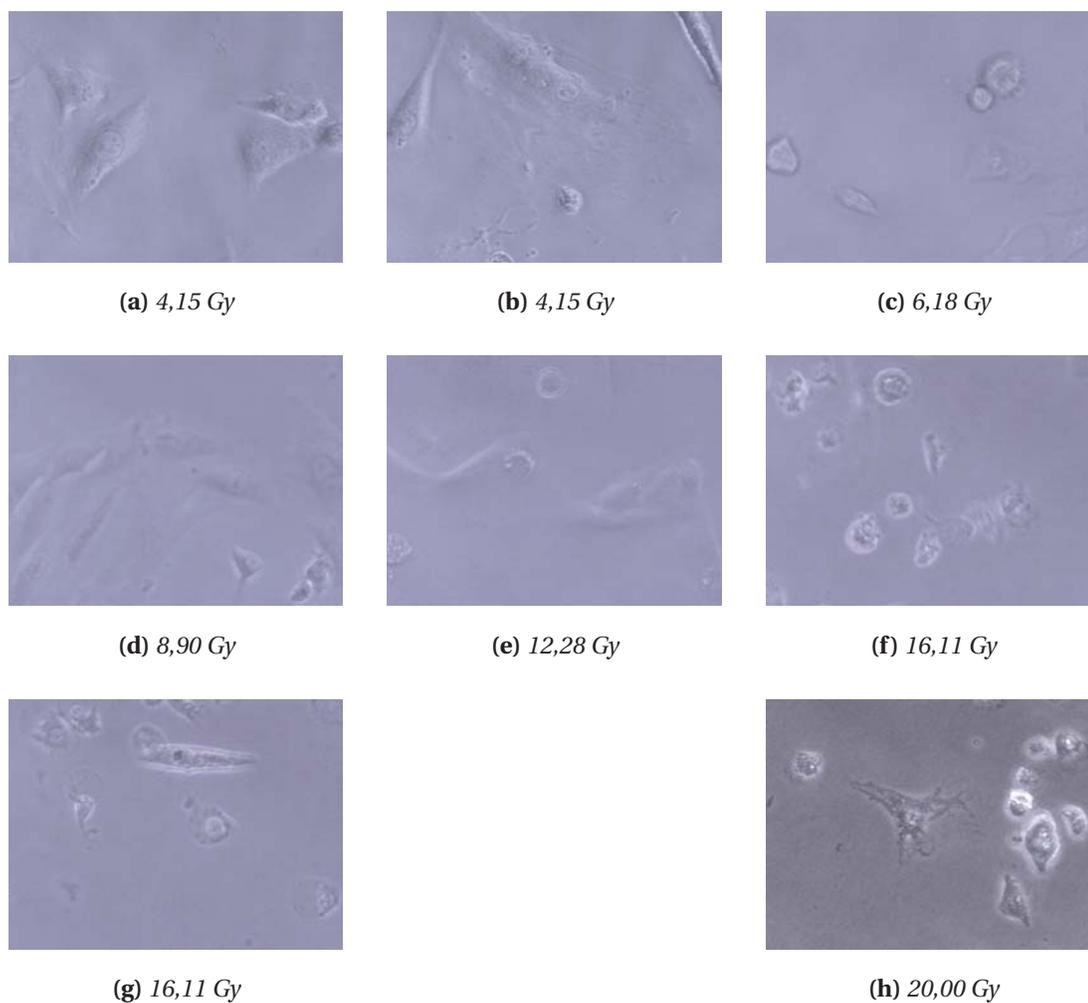


Figura 6.20: Imágenes correspondientes la placa de la línea 3T3 irradiada a dosis media-altas observadas al microscopio invertido(4x).

Acá apreciamos daño en las figuras 6.20f, 6.20g y 6.20h correspondientes a las dosis de 16,11 Gy, 16,11 Gy y 20,00 Gy respectivamente, si bien se alcanzaron

dosis más altas que en la fase de prueba debemos recordar que para esta etapa se procedió a resuspender el radiofármaco al momento de dosificar, razón por la cual no apreciamos daño tan localizado como en la etapa anterior.

En la Tabla 6.3 se presentan los resultados de absorbancia leídos, así como el cálculo de los promedios correspondientes con la respectiva desviación estándar y la fracción de supervivencia (ρ/ρ_c).

DOSIS (Gy)	ABSORBANCIA						ρ/ρ_c	$\Delta(\rho/\rho_c)$
	A	B	C	D	PROM.	DESV. EST.		
0	0,378	0,408	0,428	0,297	0,38	0,06	1,00	0,00
0,000099	0,511	0,441	0,465	0,442	0,46	0,03	1,2	0,1
0,000219	0,537	0,535	0,464	0,396	0,48	0,07	1,28	0,02
0,000257	0,442	0,394	0,452	0,336	0,41	0,05	1,07	0,02
0,000296	0,537	0,469	0,618	0,408	0,51	0,09	1,34	0,03
0,000336	0,557	0,701	0,694	0,357	0,6	0,2	1,5	0,2
4,150	0,574	0,474	0,485	0,461	0,50	0,05	1,32	0,07
6,180	0,485	0,600	0,556	0,527	0,54	0,05	1,43	0,09
8,900	0,506	0,514	0,494	0,502	0,504	0,008	1,3	0,2
12,280	0,575	0,604	0,607	0,346	0,5	0,1	1,4	0,1
16,110	0,121	0,128	0,116	0,114	0,120	0,006	0,32	0,03
20,000	0,102	0,096	0,100	0,089	0,097	0,006	0,26	0,02

Tabla 6.3: Absorbancia de la línea 3T3 irradiadas.

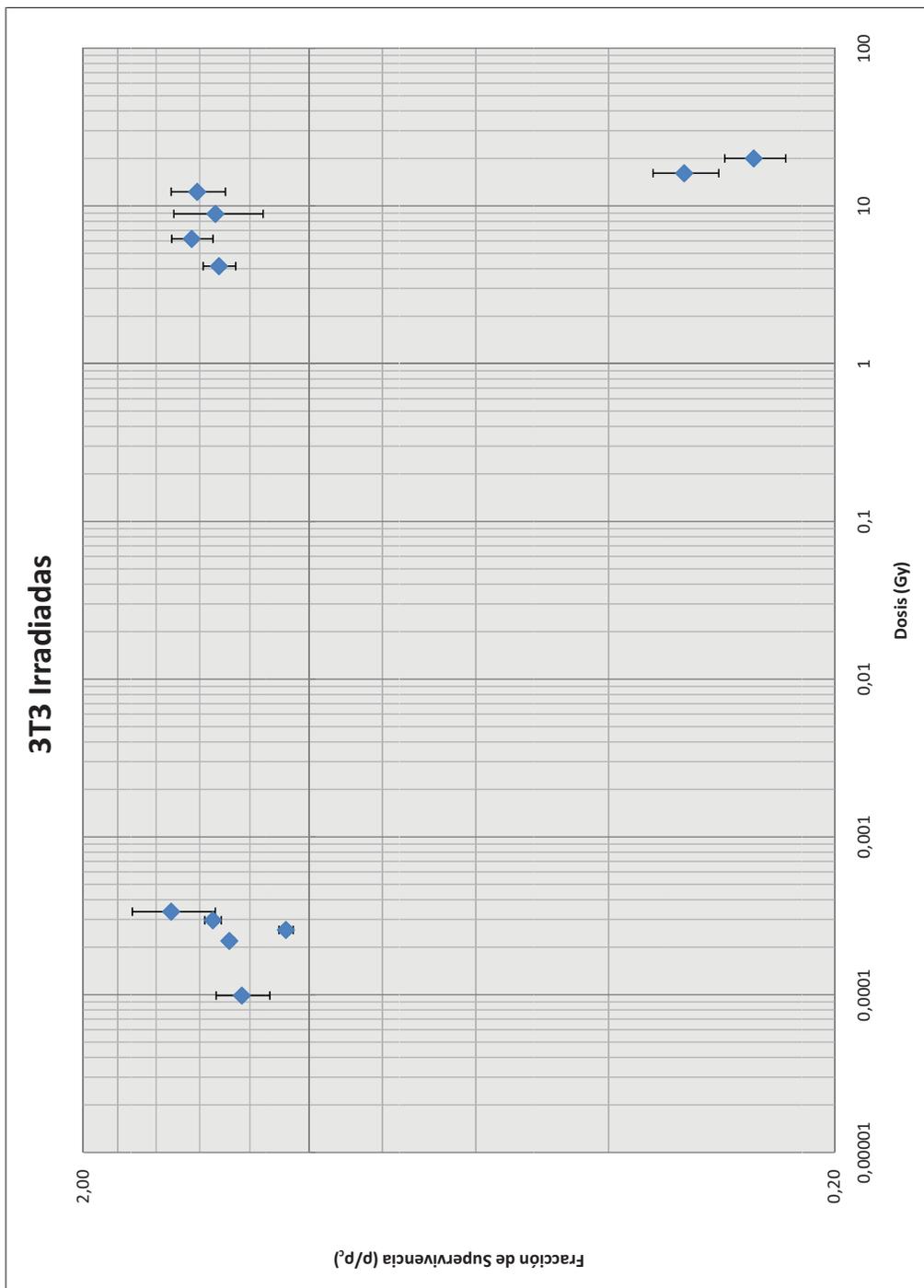


Figura 6.2.1: Supervivencia Celular de la línea 3T3 Irradiadas

Esta línea evidencia, en concordancia con lo observado al microscopio, una caída poblacional en los dos últimos valores de dosis, y en comparación con la columna control un ligero aumento de los valores de absorbancia hasta los 12,28 Gy.

Placas con Medio traspasado

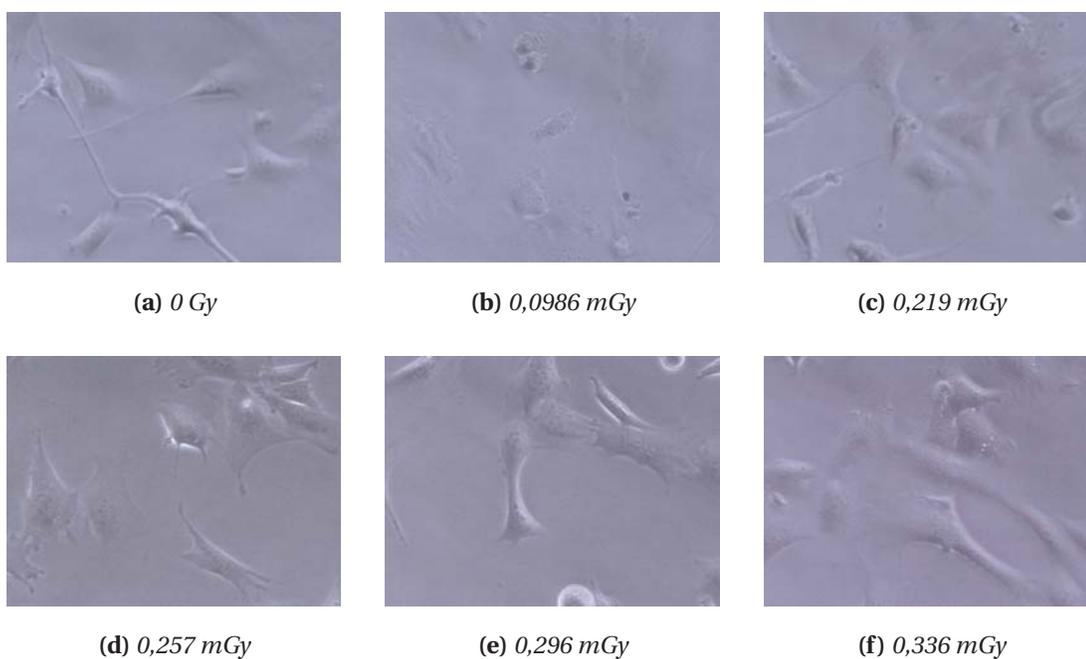


Figura 6.22: Registro de la línea 3T3 con medio traspasado a bajas dosis (4x).

De manera análoga a lo que se presentó en el caso de las placas irradiadas, a bajas dosis no se observó ningún cambio al microscopio.

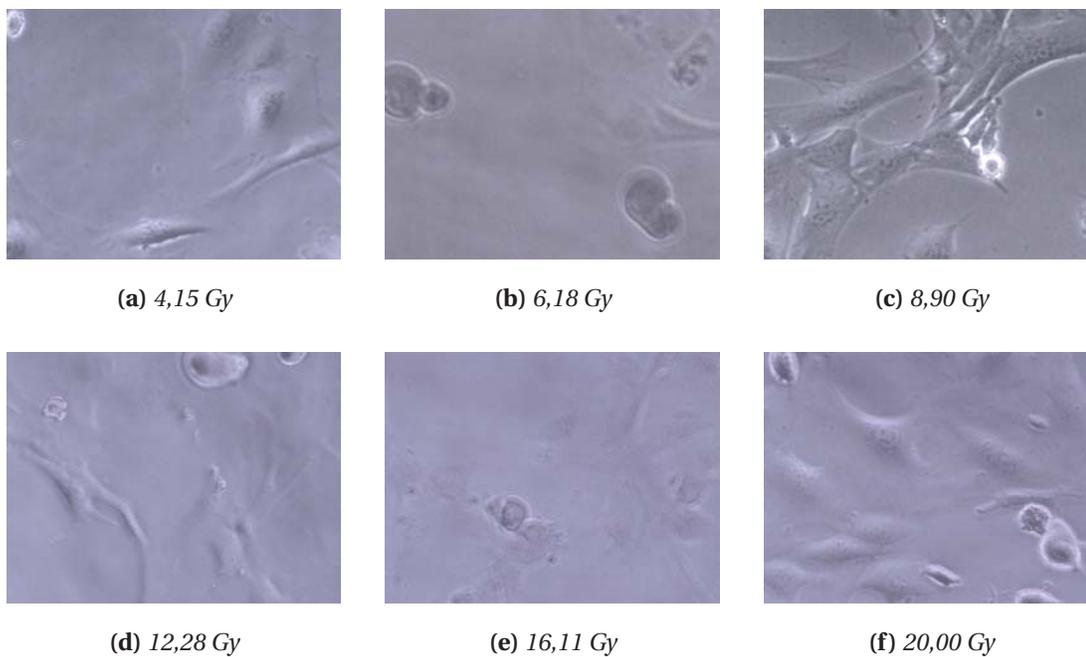


Figura 6.23: Registro de la línea 3T3 con medio traspasado a dosis media-altas (4x).

De igual forma, las células a las que se les traspasó medio irradiado a altas dosis no expresaron cambios a la vista del microscopio.

En la Tabla 6.4 se presentan los resultados cuantitativos para esta línea en la primera fase.

DOSIS (Gy)	ABSORBANCIA						ρ/ρ_c	$\Delta(\rho/\rho_c)$
	A	B	C	D	PROM.	DESV. EST.		
0,000000	1,021	0,992	1,001	0,986	1,00	0,02	1,000	0,000
0,000099	0,974	0,977	1,098	0,988	1,01	0,06	1,01	0,04
0,000219	1,079	1,003	1,091	1,025	1,05	0,04	1,05	0,03
0,000257	0,991	1,048	1,052	1,056	1,04	0,03	1,04	0,01
0,000296	1,283	1,031	0,948	1,116	1,1	0,1	1,1	0,1
0,000336	0,994	1,018	0,981	0,911	0,98	0,05	0,98	0,03
4,150	0,916	0,993	1,018	0,922	0,96	0,05	0,96	0,04
6,180	1,029	1,100	1,030	0,979	1,03	0,05	1,03	0,03
8,900	1,019	1,035	1,019	1,098	1,04	0,04	1,04	0,02
12,280	1,041	1,063	1,006	0,914	1,01	0,07	1,01	0,05
16,110	1,021	1,034	1,041	0,630	0,9	0,2	0,9	0,2
20,000	0,896	0,882	0,817	0,673	0,8	0,1	0,82	0,09

Tabla 6.4: Absorbancia de la línea 3T3 con medio traspasado.

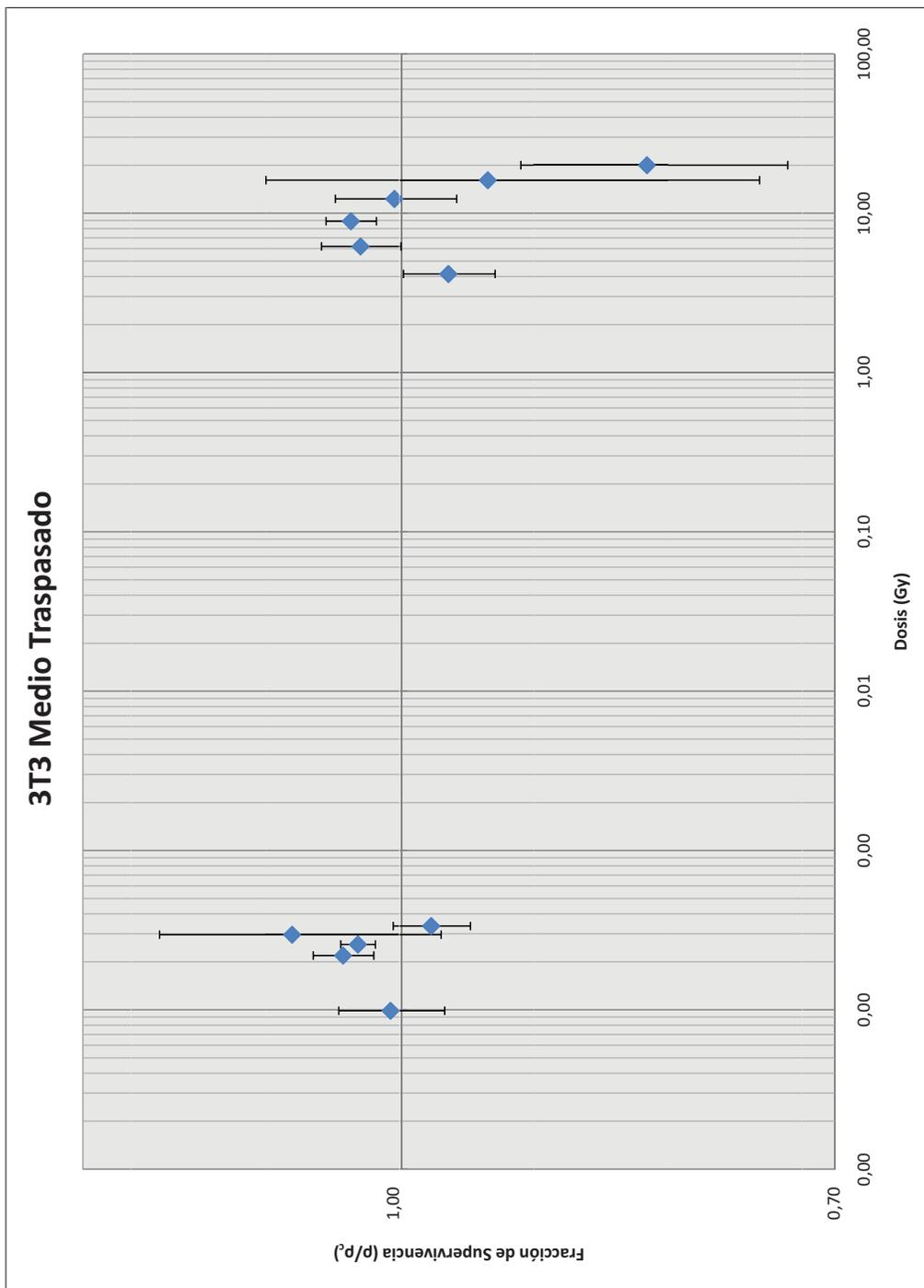


Figura 6.24: Supervivencia Celular de la línea 3T3 con medio traspasado

En la gráfica podemos apreciar una disminución en la fracción de supervivencia para los últimos valores de dosis aplicado, decimos entonces que se evidencia así la presencia del efecto Bystander ya que de manera análoga a su par irradiado, estos son los valores para los cuales se observó disminución de la supervivencia.

6.2.2. Línea HT-29

Placas Irradiadas

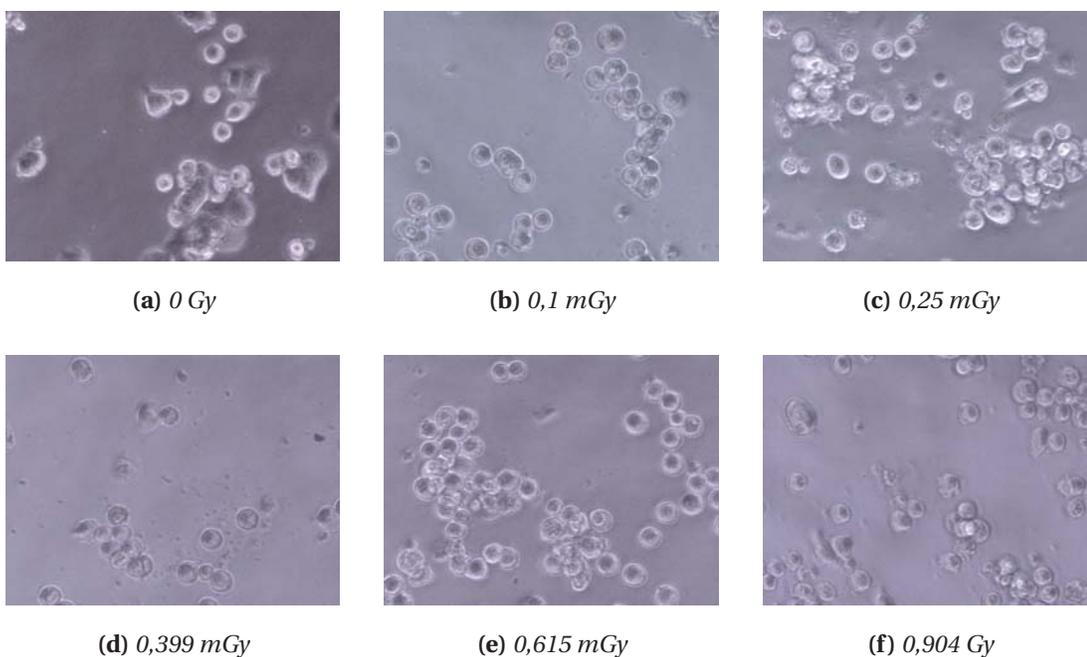


Figura 6.25: Imágenes correspondientes la placa de la línea HT-29 irradiada a bajas dosis observadas al microscopio invertido(4x).

Con estas primeras dosis aplicadas no se observan daños al microscopio.

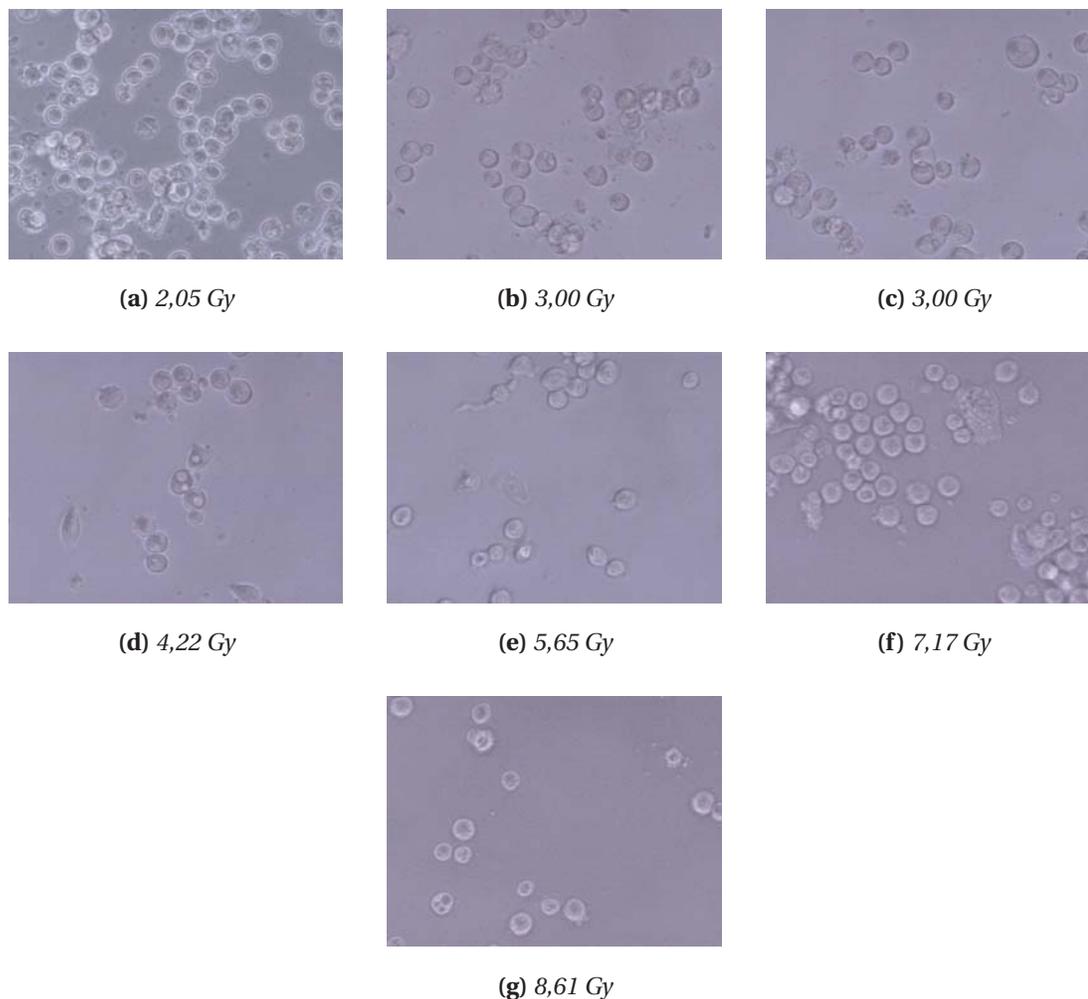


Figura 6.26: Imágenes correspondientes la placa de la línea HT-29 irradiada a dosis medias altas observadas al microscopio invertido(4x).

Esta línea al microscopio no muestra daños significativos. La limitante en este experimento es que no pudieron alcanzarse dosis tan altas como con la línea 3T3, así que no hay información suficiente para decir a partir de que dosis se observa daño en ella.

DOSIS (Gy)	ABSORBANCIA						ρ/ρ_c	$\Delta(\rho/\rho_c)$
	A	B	C	D	PROM.	DESV. EST.		
0	0,103	0,103	0,105	0,091	0,101	0,006	1,00	0,00
0,000099	0,217	0,259	0,176	0,156	0,20	0,05	2,0	0,3
0,000219	0,588	0,553	0,450	0,440	0,51	0,07	5,1	0,4
0,000257	0,611	0,556	0,647	0,595	0,60	0,04	5,99	0,01
0,000296	0,786	0,700	0,830	0,613	0,7	0,1	7,3	0,5
0,000336	0,795	0,882	0,753	0,763	0,80	0,06	7,94	0,08
2,050	0,299	0,384	0,442	0,498	0,41	0,09	4,0	0,6
3,000	0,669	0,598	0,592	0,513	0,59	0,06	5,9	0,3
4,220	0,701	0,673	0,623	0,649	0,66	0,03	6,58	0,09
5,650	0,772	0,435	0,758	0,746	0,7	0,2	7	1
7,170	0,880	0,818	0,896	0,953	0,89	0,06	8,82	0,01
8,610	0,970	1,167	0,967	0,923	1,0	0,1	10,0	0,4

Tabla 6.5: Absorbancia de la línea HT-29 irradiadas (Primera Fase).

A nivel cuantitativo estamos ante la presencia de un resultado que no se esperaba cuando se iniciaron los experimentos, hay un aumento en la población celular al elevar la dosis entregada.

Por otra parte para el cálculo de la fracción de supervivencia tenemos que hacer un cociente por el valor de absorbancia de la población de control (ecuación

4.2.1) y desde antes de irradiar las placas notamos que este control presentó un problema, ya que al observar esta columna al microscopio notamos que su población era considerablemente menor a las demás columnas sembradas a esta densidad, pese a esta observación se continuó con el desarrollo del experimento, no podía desecharse todo el material invertido en él.

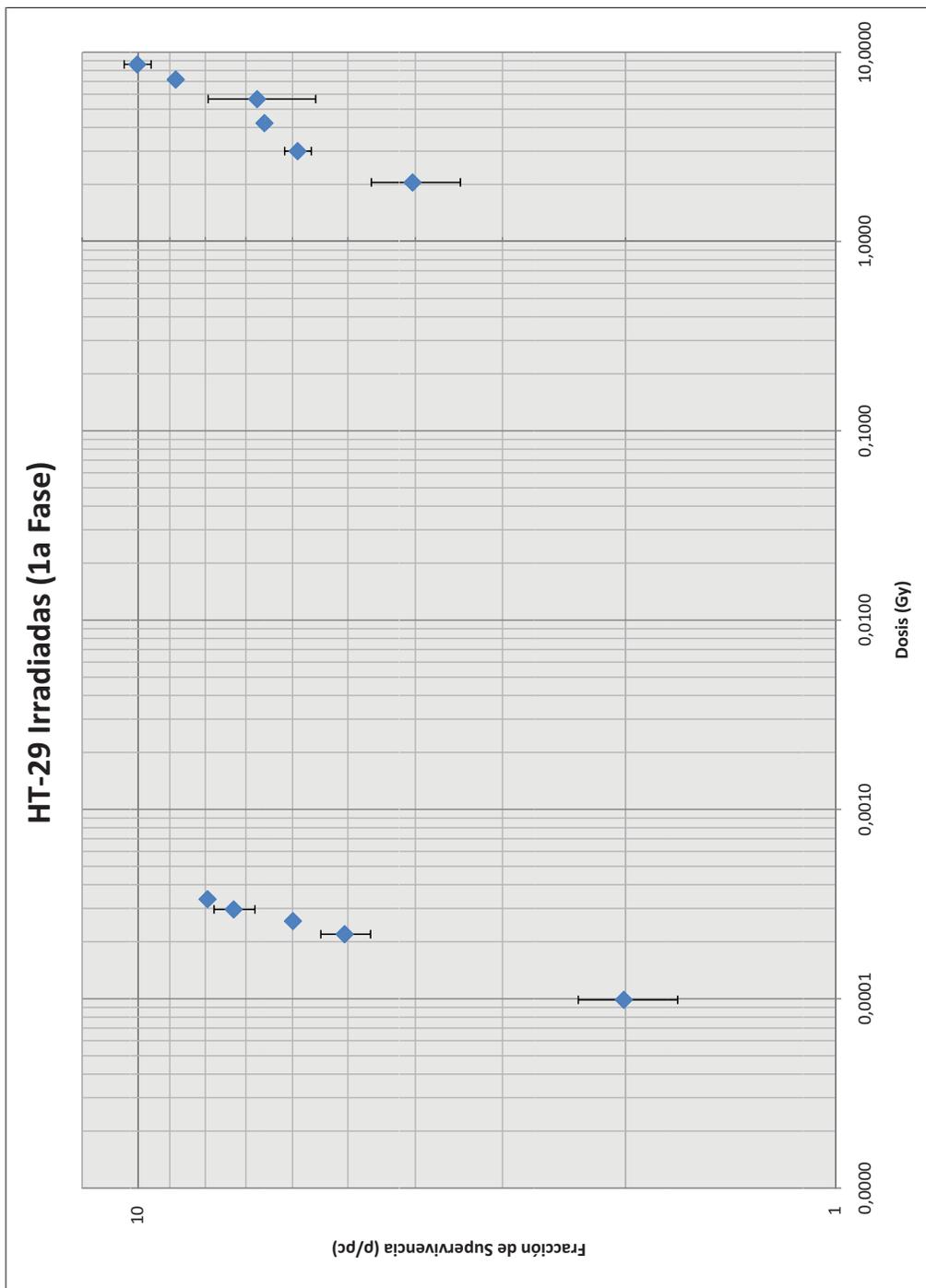


Figura 6.27: Supervivencia Celular de la línea HT-29 Irradiadas

Al examinar la curva de supervivencia, podemos observar los valores tan elevados que adquiere consistentemente con lo esperado al haber obtenido una baja absorbancia en la columna control.

Placas con Medio Traspasado

En las figuras 6.28 y 6.29 no observamos ningún cambio al microscopio.

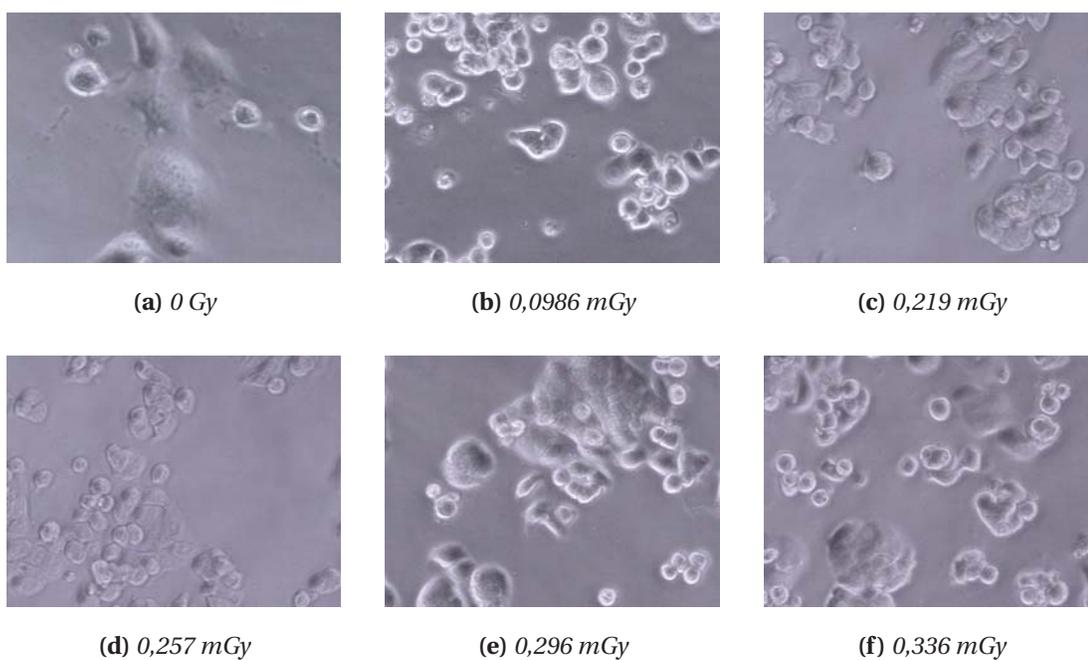


Figura 6.28: Registro de la línea HT-29 con medio traspasado a bajas dosis (4x).

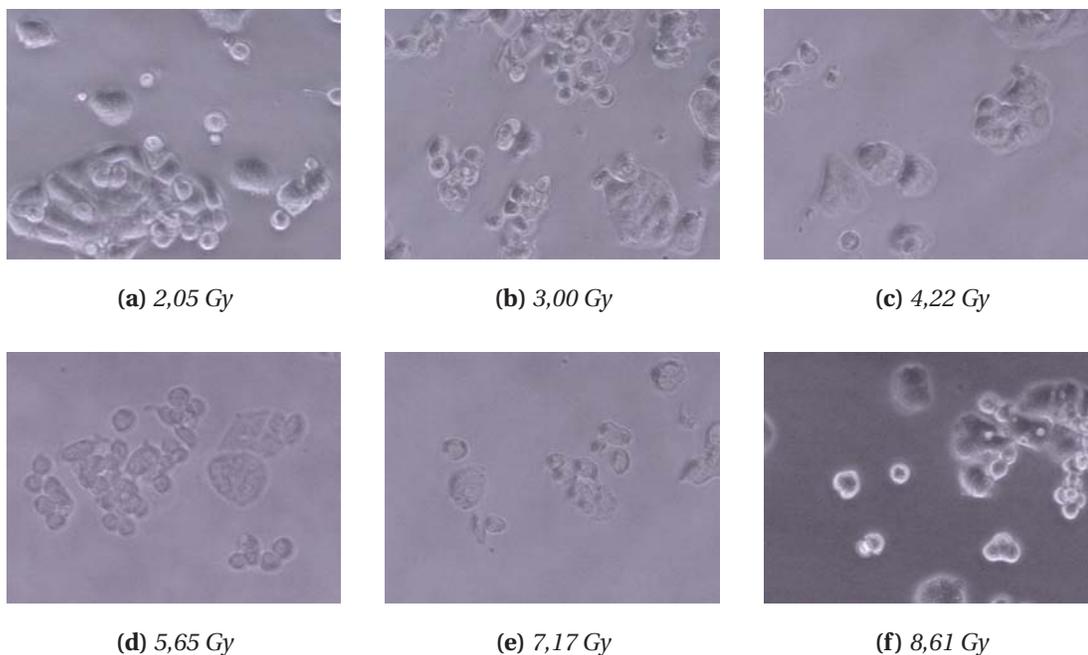


Figura 6.29: Registro de la línea HT-29 con medio traspasado a dosis media-altas (4x).

Tenemos en la tabla 6.6 valores de absorbancia significativamente mayores a los encontrados en los cultivos irradiados, es oportuno mencionar que por el tiempo que transcurrió para hacer la lectura de las placas las células tuvieron oportunidad de seguir duplicándose, sin embargo, para los dos últimos valores de dosis encontramos una ligera disminución en la fracción de supervivencia.

DOSIS (Gy)	ABSORBANCIA						ρ/ρ_c	$\Delta(\rho/\rho_c)$
	A	B	C	D	PROM.	DESV. EST.		
0	2,244	2,396	2,426	2,189	2,3	0,1	1,000	0,000
0,000099	2,650	2,325	2,394	2,459	2,5	0,1	1,062	0,008
0,000219	2,706	2,440	2,402	2,397	2,5	0,1	1,07	0,01
0,000257	2,470	2,598	2,524	2,669	2,57	0,09	1,11	0,02
0,000296	2,473	2,571	2,450	2,630	2,53	0,08	1,09	0,02
0,000336	2,561	2,437	2,435	2,348	2,45	0,09	1,06	0,01
2,050	2,435	1,882	2,744	1,585	2,2	0,5	0,9	0,2
3,000	—	1,888	2,445	1,877	2,1	0,3	0,9	0,1
4,220	2,073	2,385	2,853	2,098	2,4	0,4	1,0	0,1
5,650	2,085	2,136	2,170	2,049	2,11	0,05	0,91	0,02
7,170	1,687	2,085	2,086	2,103	2,0	0,2	0,86	0,04
8,610	1,763	1,770	2,195	1,793	1,9	0,2	0,81	0,05

Tabla 6.6: Absorbancia de la línea HT-29 con medio traspasado (Primera Fase).

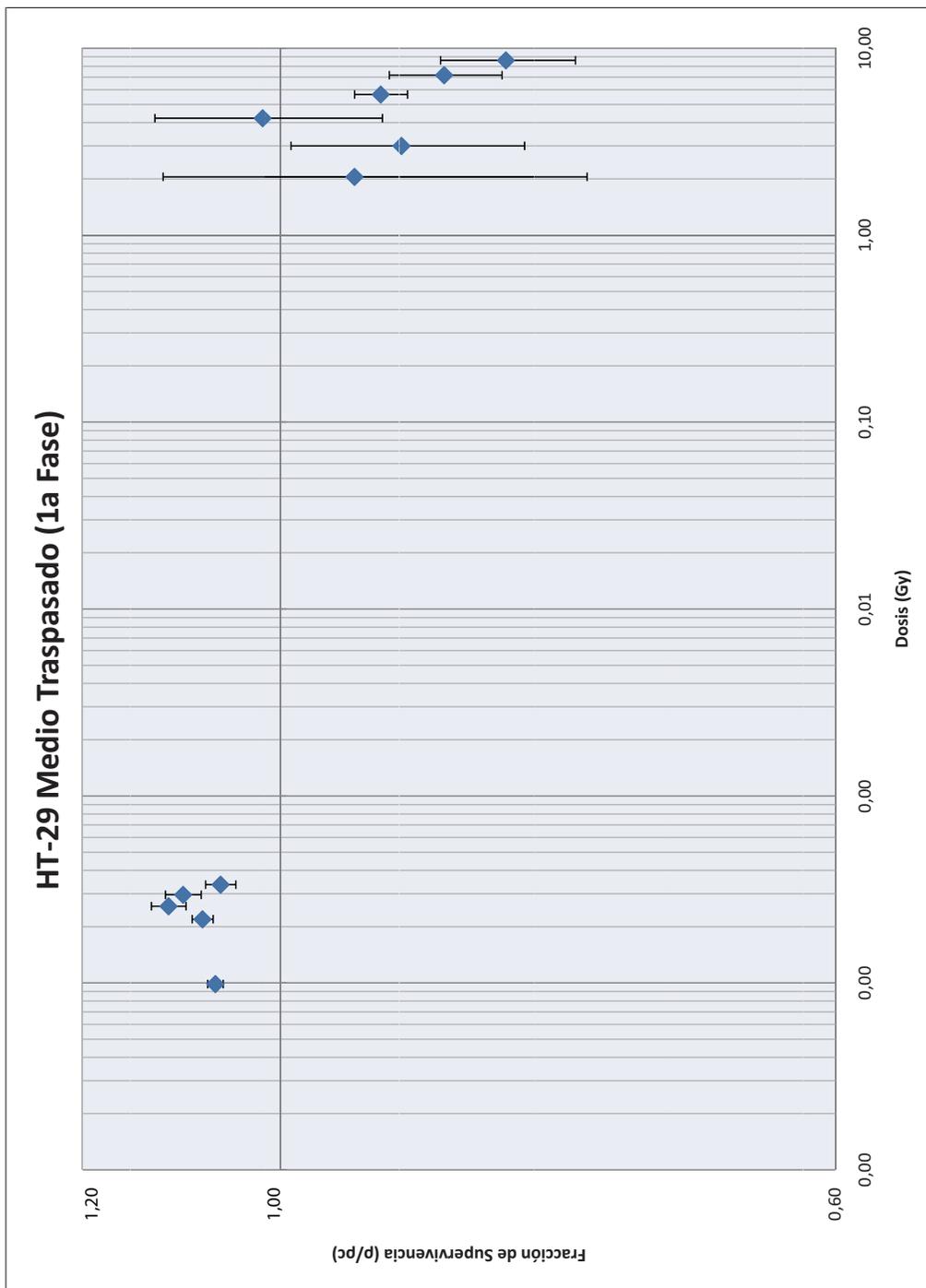


Figura 6.30: Supervivencia Celular de la línea HT-29 con medio traspasado

6.3. Segunda Fase

Los valores de exposición alcanzados en esta fase se muestran en la Tabla 6.7:

Exposición (mRem)	
Operador	8,2
Asistente	1,4

Tabla 6.7: Valores de exposición durante la primera fase.

A continuación se presenta el registro tomado en esta etapa de los experimentos, se hicieron varias series y se muestran las imágenes en las que se observaron las alteraciones.

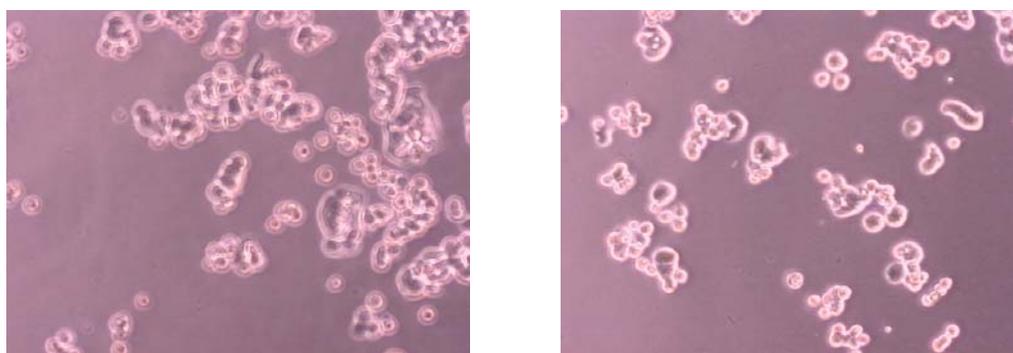


Figura 6.31: Registro inicial de la línea HT-29, antes de trasladarlas para su irradiación (10x).

6.3.1. Irradiadas

Las imágenes a continuación corresponden a los daños observados en las placas, éstos empiezan a evidenciarse a partir de los 11,22 Gy. Podemos visualizar en ellas rompimiento de la membrana celular, al notar la discontinuidad en el contorno de algunas células, así como restos de células en el medio. Confirmamos de esta manera que las dosis alcanzadas en la fase anterior no nos permitieron observar daños celulares al microscopio y a la vez, es un resultado alarmante ya que la dosis a las que estos se aprecian son elevados.

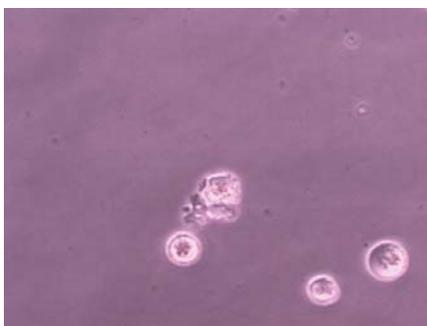


Figura 6.32: Registro de la línea HT-29, tomado después de la irradiación a dosis de 11,22 Gy(10x).

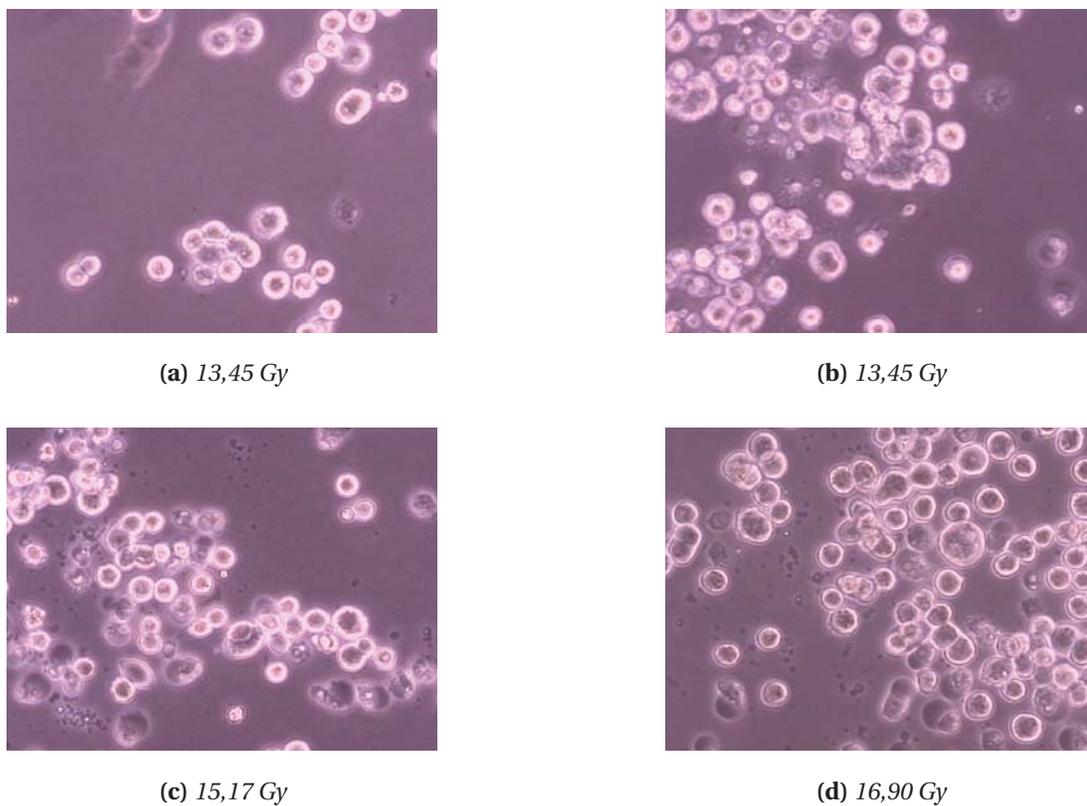


Figura 6.33: Registro de la línea HT-29, tomado después de la irradiación (4x).

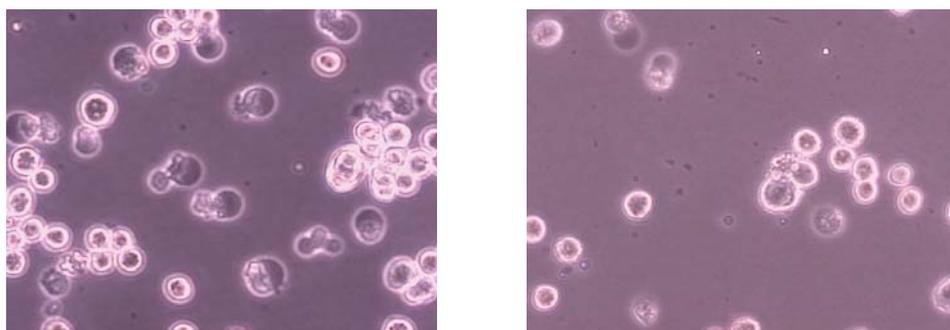


Figura 6.34: Registro de la línea HT-29, tomado después de la irradiación a dosis de 18,60 Gy(10x).

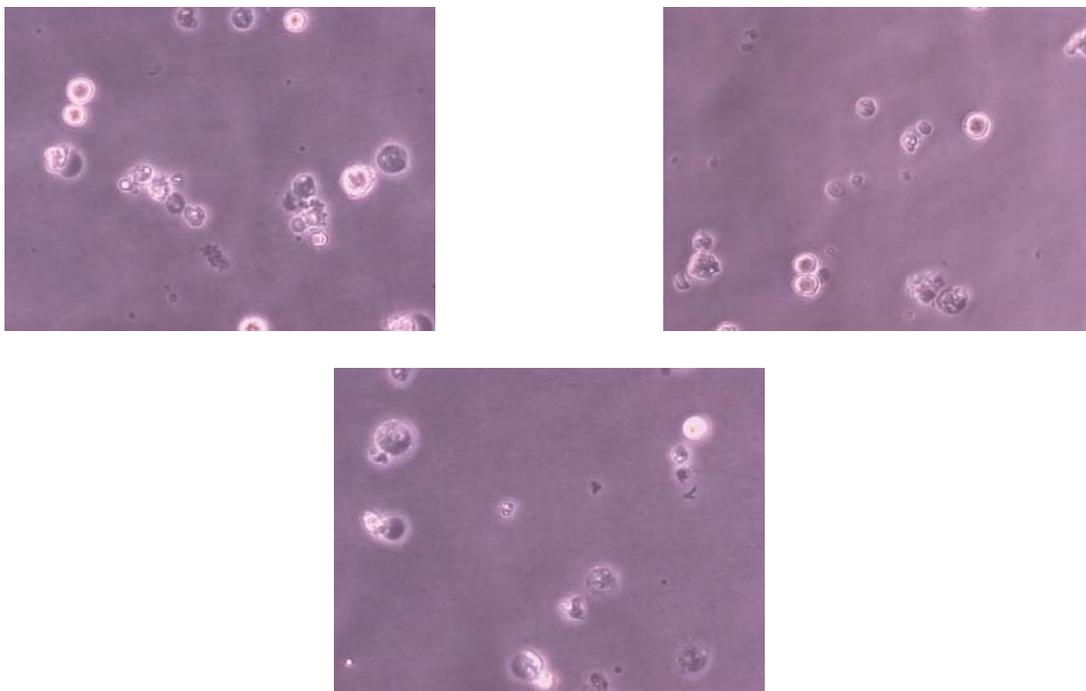


Figura 6.35: Registro de la línea HT-29, tomado después de la irradiación a dosis de 20,23 Gy(10x).

Para esta fase se dejó una columna control en cada una de las placas empleadas; en la Tabla 6.8 tenemos los resultados correspondientes a la absorbancia leída en dichas columnas:

DOSIS (Gy)	ABSORBANCIA					
	A	B	C	D	PROM.	DESV. EST.
0,000	0,083	0,088	0,080	0,069	0,080	0,008
0,000	0,115	0,124	0,148	0,105	0,12	0,02
0,000	0,098	0,091	0,061	0,088	0,08	0,02
0,00000	0,074	0,062	0,110	0,113	0,09	0,03

Tabla 6.8: Absorbancia de los controles para la línea HT-29 irradiadas (Segunda Fase).

Al promediar estos resultados tenemos:

Dosis (Gy)	ABSORBANCIA	
	PROM.	DESV. EST.
0,000	0,094	0,004

Tabla 6.9: Resultado promediado de las columnas de control en la línea HT-29 irradiadas (Segunda Fase).

Para las dosis entregadas, los resultados de absorbancia se muestran en la Tabla 6.10.

DOSIS (Gy)	ABSORBANCIA						ρ/ρ_c	$\Delta(\rho/\rho_c)$
	A	B	C	D	PROM.	DESV. EST.		
0,00000	—	—	—	—	0,094	0,004	1,00	0,00
0,0001	0,101	0,017	0,084	0,091	0,073	0,038	1,1	0,1
0,0002	0,115	0,039	0,095	0,082	0,083	0,032	1,2	0,4
0,0004	0,114	0,019	0,128	0,093	0,088	0,048	1,2	0,2
0,0006	0,115	0,039	0,125	0,061	0,085	0,042	1,2	0,4
0,0008	0,124	0,032	0,113	0,085	0,088	0,041	1,3	0,3
0,50	0,113	0,015	0,115	0,133	0,094	0,054	1,2	0,1
0,79	0,103	0,013	0,102	0,100	0,080	0,044	1,10	0,09
1,24	0,096	0,006	0,101	0,100	0,076	0,046	1,02	0,03
1,94	0,080	0,013	0,088	0,094	0,069	0,037	0,9	0,1
3,79	0,063	0,016	0,062	0,084	0,056	0,029	0,7	0,1
4,52	0,091	0,022	0,104	0,082	0,075	0,036	1,0	0,2
5,80	0,102	0,010	0,116	0,094	0,081	0,048	1,08	0,06
7,35	0,103	0,024	0,077	0,088	0,073	0,034	1,1	0,2
9,17	0,095	0,019	0,082	0,086	0,070	0,035	1,0	0,2
11,22	0,119	0,025	0,126	0,134	0,101	0,051	1,3	0,2
13,45	0,079	0,028	0,090	0,111	0,077	0,035	0,8	0,3
15,17	0,085	0,021	0,095	0,109	0,077	0,039	0,9	0,2

Tabla 6.10: Absorbancia de la línea HT-29 Irradiadas (Segunda Fase).

DOSIS (Gy)	ABSORBANCIA						ρ/ρ_c	$\Delta(\rho/\rho_c)$
	A	B	C	D	PROM.	DESV. EST.		
16,90	0,099	0,022	0,122	0,095	0,084	0,043	1,1	0,2
18,60	0,087	0,009	0,091	0,097	0,071	0,041	0,92	0,06
20,23	0,071	0,022	0,060	0,080	0,058	0,025	0,8	0,2

Tabla 6.10: Absorbancia de la línea HT-29 Irradiadas (Segunda Fase).

Ahora bien, a nivel cuantitativo tenemos los resultados expresados en la Tabla 6.10 y en la Figura 6.36, nuevamente notamos un rango en el que hay crecimiento poblacional así como una disminución para las dosis más altas, sin embargo, tenemos un inconveniente, debido a las bajas densidades sembradas en esta fase los errores asociados son elevados pero que finalmente aportan información sobre el patrón de crecimiento.

Este patrón nos hace cuestionar lo que sucede y plantear la posibilidad de que al decaer el ^{18}F presente en el FDG, la glucosa que queda en el medio esté estimulando dicho crecimiento al proveerle más nutrientes a los cultivos.

6.3.2. Medio Traspasado

A continuación presentamos las imágenes de las placas con medio traspasado, se aprecian restos celulares en el medio de cultivo que pudieran estar asociados a la presencia del efecto “bystander”, visualmente no tenemos la certeza ya que no apreciamos ruptura de la membrana celular como en el caso de las irradiadas, pero difieren de los resultados encontrados en la fase anterior en este aspecto, ya que en aquellas imágenes no observamos restos celulares.

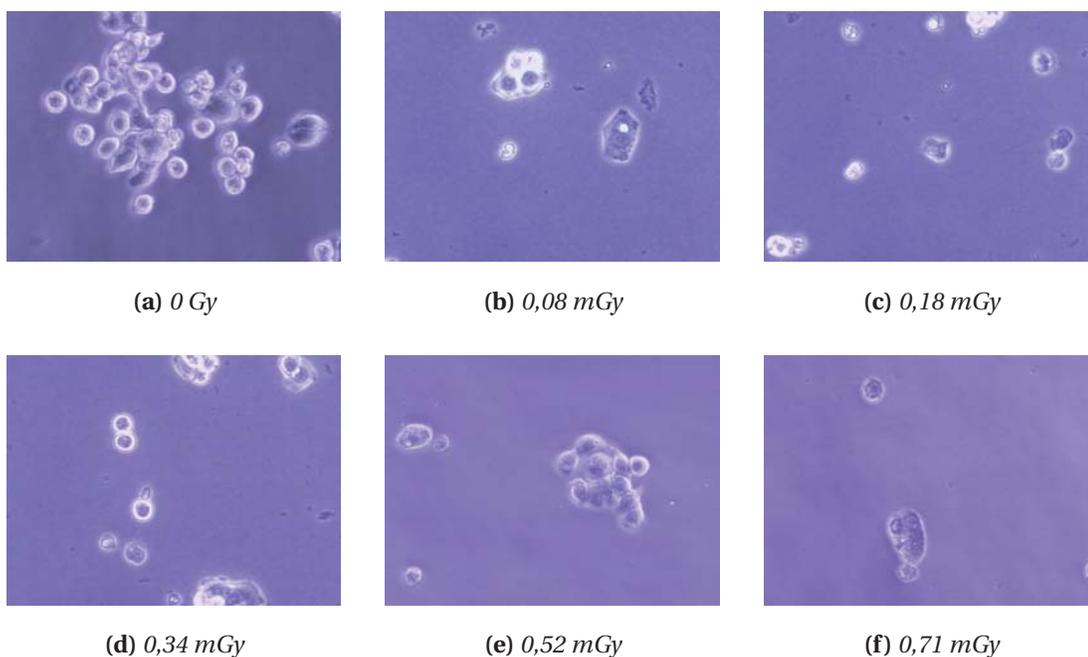


Figura 6.37: Imágenes correspondientes a algunos daños observados en las placas con medio traspasado (10x).

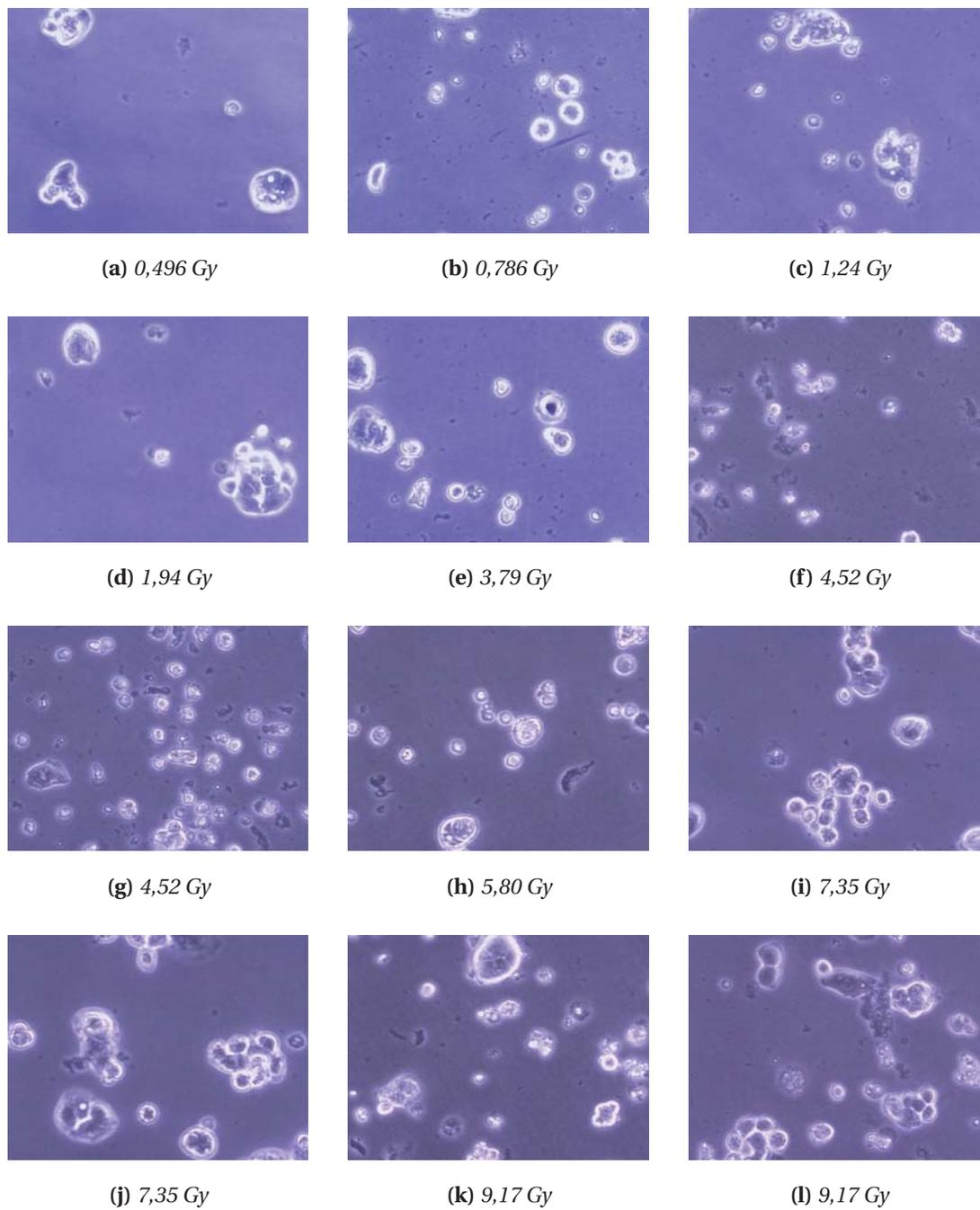


Figura 6.38: Imágenes correspondientes a algunos daños observados en las placas con medio traspasado (10x) (continuación 2).

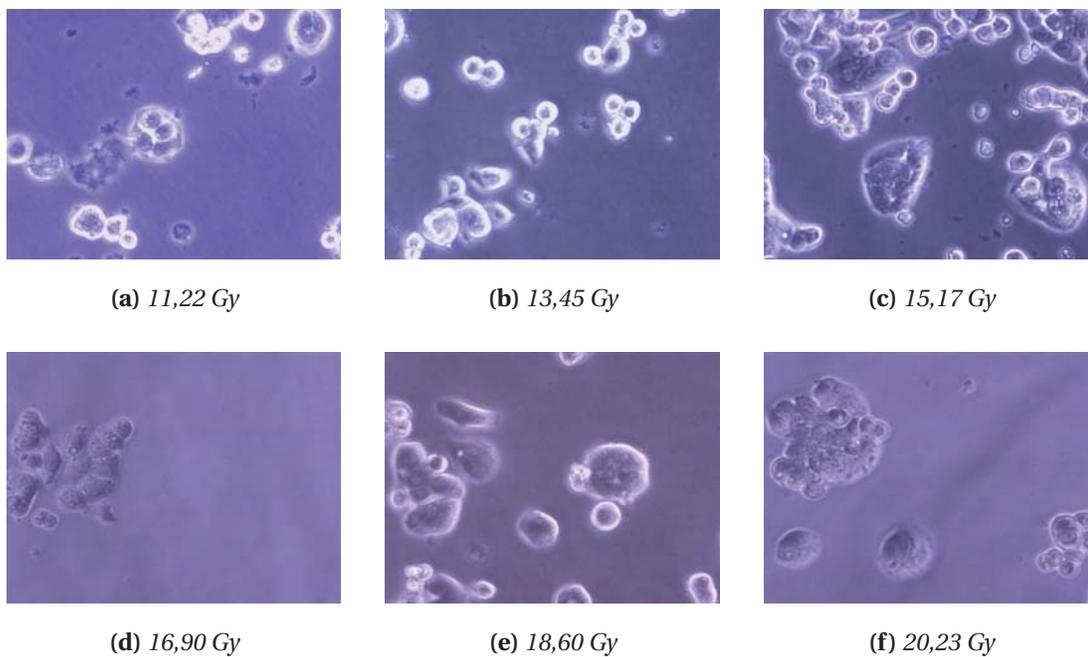


Figura 6.39: *Imágenes correspondientes a algunos daños observados en las placas con medio traspasado (10x) (continuación 3).*

La absorbancia leída en las columnas control se aprecian en la Tabla 6.11:

DOSIS (Gy)	ABSORBANCIA					
	A	B	C	D	PROM.	DESV. EST.
0,000	0,050	0,021	0,025	0,038	0,034	0,013
0,000	0,033	0,043	0,039	0,008	0,031	0,016
0,000	0,059	0,049	0,034	0,047	0,047	0,010
0,000	0,001	0,084	0,007	0,010	0,026	0,039

Tabla 6.11: Absorbancia de los controles para la línea HT-29 con medio traspasado (Segunda Fase).

Promediando los resultados de los controles tenemos:

DOSIS (Gy)	ABSORBANCIA	
	PROM.	DESV. EST.
0,000	0,70	0,04

Tabla 6.12: Resultado promediado de las columnas de control en la línea HT-29 con Medio Traspasado.

Finalmente, la absorbancia de las cuatro placas con medio traspasado se observa en la tabla 6.13:

DOSIS (Gy)	ABSORBANCIA						ρ/ρ_c	$\Delta(\rho/\rho_c)$
	A	B	C	D	PROM.	DES. EST.		
0,00000	—	—	—	—	0,094	0,004	1,00	0,00
0,00009	0,101	0,017	0,084	0,091	0,07	0,04	1,1	0,1
0,0002	0,115	0,039	0,095	0,082	0,08	0,03	1,2	0,4
0,0004	0,114	0,019	0,128	0,093	0,09	0,05	1,2	0,2
0,0006	0,115	0,039	0,125	0,061	0,08	0,04	1,2	0,4
0,0008	0,124	0,032	0,113	0,085	0,09	0,04	1,3	0,3
0,496	0,113	0,015	0,115	0,133	0,09	0,05	1,2	0,1
0,786	0,103	0,013	0,102	0,100	0,08	0,04	1,10	0,09
1,239	0,096	0,006	0,101	0,100	0,08	0,05	1,02	0,03
1,936	0,080	0,013	0,088	0,094	0,07	0,04	0,9	0,1
3,791	0,063	0,016	0,062	0,084	0,06	0,03	0,7	0,1
4,517	0,091	0,022	0,104	0,082	0,07	0,04	1,0	0,2
5,804	0,102	0,010	0,116	0,094	0,08	0,05	1,08	0,06
7,354	0,103	0,024	0,077	0,088	0,07	0,03	1,1	0,2
9,170	0,095	0,019	0,082	0,086	0,07	0,03	1,0	0,2
11,221	0,119	0,025	0,126	0,134	0,10	0,05	1,3	0,2
13,451	0,079	0,028	0,090	0,111	0,08	0,04	0,8	0,3

Tabla 6.13: Absorbancia de la línea HT-29 con medio traspasado (Segunda Fase).

DOSIS (Gy)	ABSORBANCIA						ρ/ρ_c	$\Delta(\rho/\rho_c)$
	A	B	C	D	PROM.	DESV. EST.		
15,173	0,085	0,021	0,095	0,109	0,08	0,04	0,9	0,2
16,905	0,099	0,022	0,122	0,095	0,08	0,04	1,1	0,2
18,603	0,087	0,009	0,091	0,097	0,07	0,04	0,92	0,06
20,229	0,071	0,022	0,060	0,080	0,06	0,03	0,8	0,2

Tabla 6.13: Absorbancia de la línea HT-29 con medio traspasado (Segunda Fase).

Una vez más el comportamiento observado en las células de medio traspasado es análogo al de su par irradiado, si no estuviese presente el efecto deberíamos tener puntos experimentales aproximadamente constantes y no es el caso, hay definitivamente algo en el medio que hace que las células no irradiadas exhiban este patrón.

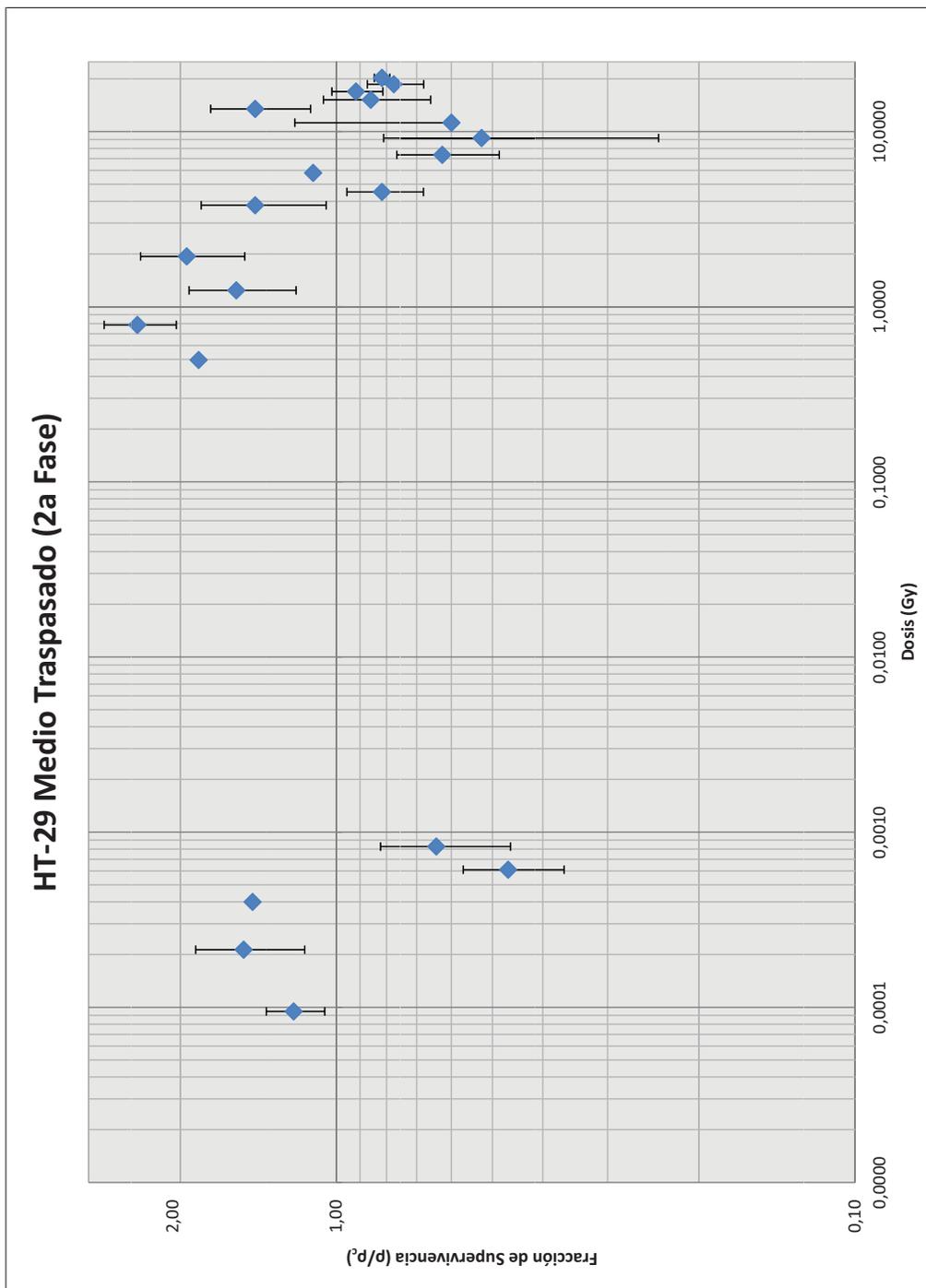


Figura 6.40: Supervivencia Celular de la línea HT-29 con medio traspasado (Segunda Fase).

6.4. Glucosa

Esta última serie de experimentos fue realizada con el propósito de rechazar o comprobar la hipótesis de que la glucosa remanente luego del decaimiento del ^{18}F presente en el radiofármaco estaba incentivando el crecimiento celular observado en las fases anteriores.

En los controles de las dos placas empleadas se obtuvieron los siguientes resultados:

Glucosa (mL)	ABSORBANCIA					
	A	B	C	D	PROM.	DESV. EST.
0,000	0,633	0,592	0,622	0,628	0,62	0,02
0,000	0,740	0,866	0,714	0,803	0,78	0,07

Tabla 6.14: Resultados de las columnas de control en la línea HT-29 con FDG decaído.

Promediando los resultados de los controles tenemos:

Glucosa (mL)	ABSORBANCIA	
	PROM.	DESV. EST.
0,000	0,70	0,04

Tabla 6.15: Resultado promediado de las columnas de control en la línea HT-29 con FDG decaído.

Dicho promedio está colocado en la tabla 6.16:

Glucosa (mL)	ABSORBANCIA						ρ/ρ_c	$\Delta(\rho/\rho_c)$
	A	B	C	D	PROM.	DESV. EST.		
0,000	—	—	—	—	0,70	0,04	1,000	0,000
0,100	0,699	0,846	0,657	0,767	0,74	0,08	1,06	0,06
0,200	0,640	0,874	0,754	0,823	0,8	0,1	1,10	0,09
0,300	0,608	0,715	0,632	0,733	0,67	0,06	0,96	0,04
0,400	0,520	0,598	0,563	0,669	0,59	0,06	0,84	0,05
0,500	0,458	0,533	0,496	0,549	0,51	0,04	0,73	0,02
0,600	0,398	0,508	0,458	0,534	0,47	0,06	0,68	0,05
0,700	0,431	0,588	0,536	0,669	0,6	0,1	0,8	0,1
0,800	0,392	0,550	0,466	0,628	0,5	0,1	0,7	0,1
0,900	0,362	0,438	0,417	0,440	0,41	0,04	0,59	0,02
1,000	0,333	0,421	0,356	0,420	0,38	0,04	0,55	0,04

Tabla 6.16: Absorbancia de la línea HT-29 sometida a FDG decaído.

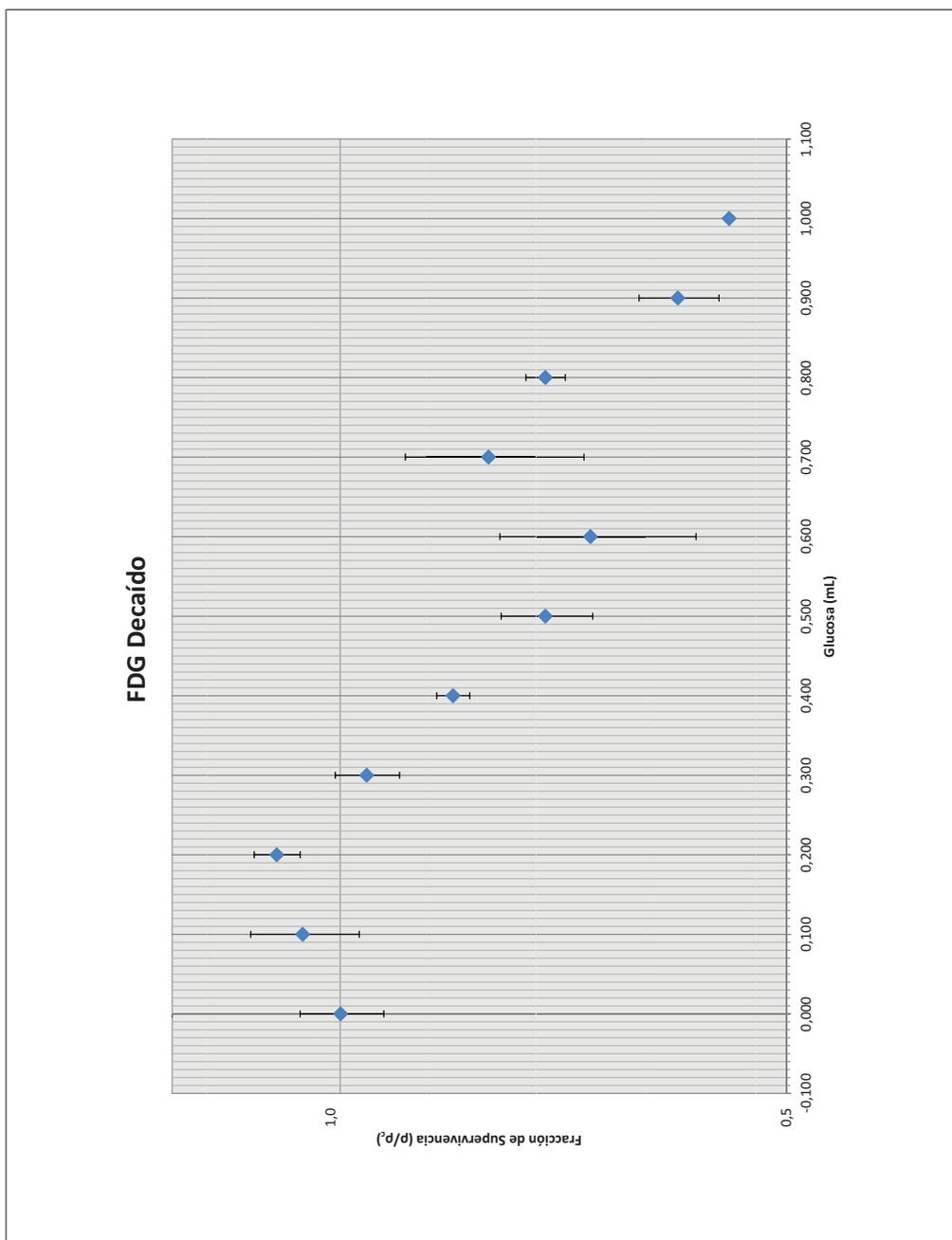


Figura 6.41: Supervivencia Celular de la línea HT-29 sometida a FDG decaído.

Es oportuno mencionar que la concentración de glucosa total es desconocida, esto se debe a que de la misma manera en que el ciclotrón elabora 16 mL de FDG por producción, no ocurre lo mismo con la actividad, una producción puede ser de 800 mCi y la siguiente de 1.000 mCi a pesar de que los parámetros fijados para la síntesis sean idénticos, por lo tanto la cantidad tomada de manosa (precursor de la glucosa) no es la misma en cada producción y como este parámetro no es de interés para los propósitos a los que se destina el radiofármaco, no se cuenta con algún método sencillo y que además sea realizable dentro de las instalaciones del ciclotrón para determinar la concentración de glucosa.

Por este motivo se tomó el excedente de cuatro diferentes producciones y se combinaron para obtener un volumen total de concentración arbitraria que hiciera posible una dosificación a partir de ella.

Los resultados obtenidos obligaron a desechar la hipótesis planteada al inicio de este último ciclo de experimentos ya que se observa una caída en la población celular a medida que se aumenta el volumen de solución incorporada a los cultivos.

Podemos decir entonces que el FDG decaído produce un efecto detrimental sobre las células al igual que la radiación ionizante, estos resultados hacen suponer que el crecimiento observado responde a alguna señal emitida por las células y que de alguna forma está presente en el medio de cultivo ya que también se aprecia el crecimiento en los cultivos con medio traspasado de las etapas anteriores del trabajo.

CONCLUSIONES

- La elaboración de un protocolo de trabajo y posterior adaptación del mismo a las necesidades de los experimentos a realizar constituyeron un factor fundamental en la realización de este proyecto.
- Las líneas celulares empleadas permitieron la preparación de los experimentos en lapsos cortos de tiempo debido a su rápida duplicación.
- Trabajar con un radiofármaco que debe manipularse directamente por el investigador aumenta considerablemente sus niveles de exposición para realizar la dosificación, lo que constituye una limitación, ya que la decisión de no realizar una última medición con la línea 3T3 estuvo motivada por los altos valores de exposición alcanzados en la primera y segunda fase de este trabajo: 8 y 9 mrem.
- La técnica de coloración aporta útiles, interesantes y detallados resultados visuales del fenómeno ocurrido a nivel celular.
- Ambas líneas celulares mostraron ser radioresistentes, la línea HT-29 exhibió además un crecimiento celular estimulado con la dosis en el rango hasta 16,9 Gy.

- Las densidades a sembrar son una decisión de suma importancia en este tipo de trabajos, se evidenció que con bajas densidades la incertidumbre asociada se eleva, lo que perturba la medición. De esta manera tenemos que con una elevada densidad de siembra se obtienen resultados cuantitativos sólidos y con baja incertidumbre.
- La glucosa residual presente en solución una vez decaído el radiofármaco tiene un efecto tóxico sobre la línea HT-29, no induce de manera alguna el crecimiento de la población celular presente en los cultivos.
- Los positrones como forma de irradiación con dosis mucho mayores a las empleadas en radiodiagnóstico demostraron ser un punto importante a estudiar para analizar efectos radiobiológicos en las líneas celulares empleadas.
- Se logró comprobar la presencia del efecto “Bystander”, partiendo de que tanto la radiación ionizante como el FDG decaído ocasionan disminución de la población celular, se puede decir que las células irradiadas están segregando alguna sustancia al medio que les indica a las otras células presentes la necesidad de recuperarse de los daños ocasionados por estos dos elementos, de esta manera se observa un aumento en la fracción de supervivencia tanto en las células irradiadas como en las de medio traspasado.

RECOMENDACIONES

Con la intencionalidad de darle continuidad a esta investigación y optimizar la metodología se hacen las siguientes recomendaciones:

- Al trabajar con un radiofármaco nos enfrentamos al problema de exposición, es por esto que sugerimos hacer un nuevo ensayo, pero esta vez empleando un acelerador de partículas como fuente de radiación ionizante, de manera tal que sea posible alcanzar dosis mayores sin que represente un peligro para el investigador. Por supuesto, esto implicaría que cada pozo sea irradiado separadamente con la finalidad de mantener el nuevo ensayo con el mismo tipo de placa empleada en este trabajo. De esta manera sería realizable una mayor repetición de medidas.
- En la segunda fase de este trabajo se presentó un inconveniente con la fijación de células a la monocapa, por esto sugerimos para un próximo ensayo, descartar el medio de cultivo pasadas 24 horas de la siembra, eliminando de esta manera las células presentes en suspensión, para finalmente sustituir el medio nutritivo descartado con medio nutritivo nuevo antes de llevar a cabo la irradiación.
- Sería conveniente realizar el experimento con el FDG completamente decaído,

con esto nos referimos a que haya transcurrido al menos 10 vidas medias del ^{18}F con la línea 3T3 para evaluar su toxicidad o inocuidad en ella.

APÉNDICES

MATERIALES Y EQUIPOS

Para la realización de este trabajo se contó con los siguientes materiales y equipos.

A.1. Línea Celular 3T3

La línea 3T3 original fue establecida en 1960 por George Todaro y Howard Green; y recibió este nombre por el protocolo empleado cuando se estableció: “3” días para “T”ransferir, inocular “3” x 10⁵ células. Pertenece a fibroblastos de ratón albino suizo (*Mus musculus*) y se duplica en 18 horas.

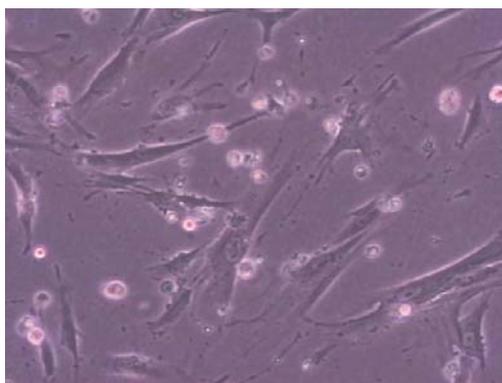


Figura A.1: Células fusiformes 3T3, 4x

A.2. Línea Celular HT-29

Esta línea está constituida por células epiteliales intestinales, más específicamente pertenecen a adenocarcinoma de colon de grado II. A diferencia de la línea 3T3, ésta es humana. Crece sin problemas en medio nutritivo RPMI y DMEM. Su tiempo de duplicación es de aproximadamente 22 horas.

La línea celular HT-29 fue establecida en 1975, derivada de células de adenocarcinoma de colon humano. A nivel morfológico, los cultivos de esta línea celular son heterogéneos y contienen subpoblaciones de células con diversa capacidad de diferenciación. Así pues, en condiciones estándar de cultivo, la población HT-29 contiene más de un 95% de células morfológicamente indiferenciadas: durante el crecimiento hacia postconfluencia, las células se van apilando y no se polarizan, formando multicapas, y no expresan marcadores de diferenciación característicos de células del epitelio intestinal adultas.

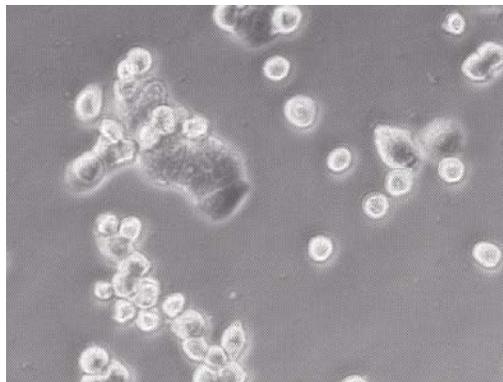


Figura A.2: *Células epiteliales de la línea celular HT-29 donde se puede observar el crecimiento en colonias, 4x.*

A.3. Frascos de Cultivo

Son botellas dedicadas al cultivo de diferentes tipos de células, son fabricadas en diferentes materiales como vidrio y plástico, las empleadas en estos experimentos son de plástico.

Estos frascos se emplean como grandes placas de Petri para el cultivo celular, tienen una tapa de rosca con ventilación y ofrecen una amplia superficie para el crecimiento celular. Son apilables y al ser transparentes facilitan su observación al microscopio.

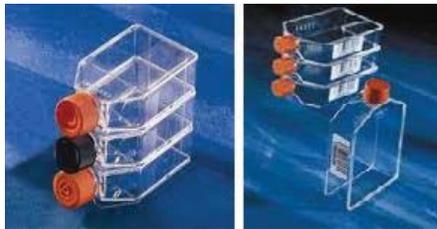


Figura A.3: *Frascos de Cultivo de 25 cm²*

A.4. Incubadora PRECISION Scientific Economy 5EG

Es una cámara aislada que permite controlar la temperatura. Posee un interior de acero inoxidable resistente a la corrosión del acero y fácil de limpiar. Combina una amplia gama de temperaturas con una excelente sensibilidad a la temperatura, la estabilidad y uniformidad.

Esta es la incubadora de la que se dispone en el CDD, por esta razón, los cultivos se mantuvieron en ella a temperatura controlada de 37°C.

A.4. INCUBADORA PRECISION SCIENTIFIC ECONOMY 5EG MATERIALES Y EQUIPOS

Volumen de la cámara	129 L
Técnica de convección	Gravedad
Temperatura	
Rango	Ambiente de +5° C to 65 °C
Uniformidad a 37 °C	± 1,0 °C
Estabilidad	± 0,5 °C
Sensibilidad	± 0,5 °C
Peso	59,9 kg
Dimensiones de la cámara (cm)	39,4 x 47,0 x 68,6

Tabla A.1: *Especificaciones de la Incubadora PRECISION Scientific Economy 5EG.*



Figura A.4: *Incubadora PRECISION, CDD.*

A.5. Incubadora de CO₂

Estos equipos tienen como finalidad mantener la temperatura en una atmósfera con una tensión controlada de CO₂ y adicionalmente de humedad elevada.

Cuenta con:

- Un dispositivo de control de temperatura, posee un termostato de seguridad que desconecta la función en caso de anomalía. Ya que mantener la estabilidad de la temperatura es una característica imprescindible de la incubadora.
- Un dispositivo que inyecta en la cámara una mezcla de aire y CO₂.
- Un dispositivo de control de la humedad ambiente. Para mantener el cultivo se requiere una humedad ambiental elevada, para minimizar la evaporación de agua del medio de cultivo. En la incubadora presente en el IBE, esto se consigue a través de bandejas de agua en el fondo de la incubadora. En los equipos más modernos se dispone de dispositivos que controlan la humedad atmosférica, inyectando agua estéril y filtrada.
- Un dispositivo de recirculación de aire. Este dispositivo se encarga de homogeneizar la temperatura en su interior.



Figura A.5: Incubadora NUAIRE, IBE.

A.6. Pipetas Graduadas

Son instrumentos de vidrio que permiten medir diferentes volúmenes de líquidos. Deben estar debidamente lavadas y esterilizadas, y una vez que entran en contacto con suspensión celular o paredes de algún contenedor deben descartarse.



Figura A.6: Pipeta

A.7. Placas de Cultivo

A.7.1. Placas de cultivo de 6x4 pozos NunclonTM Δ Surface.

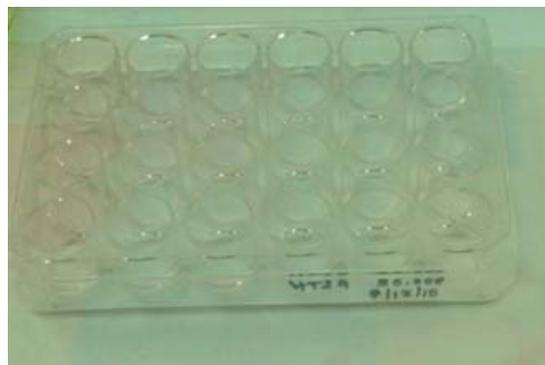
Son unas placas de poliestireno con pozos de fondo plano que poseen una superficie tratada por el fabricante para la fijación óptima de la célula y el crecimiento. Las tapas tienen la forma adecuada para un ajuste de un solo sentido. Posee Anillos en las tapas a fin de reducir la evaporación y la condensación. Así como áreas de escritura en la cara frontal y posterior, de la misma manera posee identificación alfanumérica en filas y columnas para facilitar la identificación de las muestras. No son tóxicas ni pirogénicas. Estas placas son apilables de manera que facilita su almacenamiento y traslado.

Número de Pozos	24	
Área, mm²	190	
Volumen por pozo, mL	Total	3,4
	De trabajo	0,4-1,0
Dimensiones externas, mm	128 x 86	
N° de producto	142475	

Tabla A.2: Especificaciones de las placas NunclonTM Δ Surface, según el fabricante.



(a) Placa Sellada en Empaque



(b) Placa abierta empleada en uno de los experimentos

Figura A.7: Placas NunclonTM Δ Surface

A.7.2. Placas de cultivo de 12x8 pozos CELLSTAR® Greiner Bio-One

Estas placas están diseñadas para contener 96 muestras, son estériles, su superficie está tratada para favorecer la adhesión celular, no son citotóxicas y son compatibles con los sistemas automatizados. Poseen codificación alfanumérica para facilitar la identificación de las muestras. Han sido fabricadas con poliestireno transparente por lo que se facilita la visualización al microscopio, además por su diseño son apilables. Tienen anillos de condensación en la tapa que permiten evitar la contaminación cruzada.

Número de Pozos	96	
Área, mm²	190	
Volumen por pozo, mL	Total	392 (calculado matemáticamente)
	De trabajo	25-340
Dimensiones externas, mm	127,76 x 85,48	
N° de Catálogo	655180	

Tabla A.3: Especificaciones de las placas CELLSTAR® greiner Bio-One de 96 pozos, según el fabricante.



Figura A.8: Imagen referencial de las placas CELLSTAR® greiner Bio-One de 96 pozos.

A.8. Vasos de Precipitado

Envases empleados para agitar, mezclar y calentar líquidos de uso común en laboratorios. Por lo general tienen forma cilíndrica, con un fondo plano y un labio de vertido. Poseen además graduaciones de volumen aproximadas.



Figura A.9: *Imagen referencial de vasos de precipitado o beakers.*

A.9. Gasa

A.9.1. Gasa Hidrófila

Tejido de malla abierta de algodón, blanqueada, que se utiliza para hacer vendas, compresas. Se utilizó para distribuir el etanol en la superficies y esterilizar.

A.9.2. Gasa Esterilizada

Tejido de malla abierta, estéril y suave, que se usa para fines médicos, se empleó para eliminar la condensación en la parte interna de las tapas de las placas.

A.10. Tubos de Centrífuga

Son contenedores cilíndricos de plástico con tapas de rosca, destinados al análisis de volúmenes pequeños de muestra y diseñados para ser sometidos a grandes fuerzas en la centrífuga.



Figura A.10: *Tubo de Centrífuga con su tapa.*

A.11. Camisas en Acero Inoxidable

Se utilizan como recipiente para colocar los tubos de centrífuga en la centrífuga propiamente, permite garantizar la equidad del peso entre ambos tubos a colocar en el equipo, al agregar agua gota a gota en el espacio entre la camisa y el tubo.



Figura A.11: *Camisas*

A.12. Envases de descarte

Recipientes de vidrio en los cuales se desechan los líquidos bajo la campana de flujo laminar.



Figura A.12: Envase de descarte.

A.13. Parafilm

Consiste en un plástico de parafina con un papel de apoyo, que se emplea para sellar placas y evitar así su contaminación con el aire y la humedad mientras no estén en una incubadora de CO₂. Las placas sembradas fueron selladas con este plástico antes de ser transportadas.



Figura A.13: Parafilm

A.14. Campana de flujo laminar

Es una cámara donde se establece un flujo de aire vertical, a modo de cortina, creando una barrera entre la zona donde se manejan los cultivos y donde se

sitúa el operador permitiendo así trabajar en una zona estéril. Mediante un sistema de aspiración se recoge el aire contaminado y después de pasarlo por unos filtros, devuelve una parte al medio y otra es expulsada al exterior.

La campana se debe poner en funcionamiento de 5 a 10 minutos antes de empezar a trabajar para que se establezca la circulación del aire.

La superficie en la que se trabajará debe limpiarse con unas gasas estériles impregnadas con una solución antiséptica, en este caso se empleó etanol al 70%.

Lo ideal es ingresar a la campana todos los implementos necesarios para trabajar antes de comenzar a hacerlo y preferiblemente esterilizar sus superficies cuando sea posible, todo esto con el propósito de no entrar y salir de la zona de trabajo en repetidas oportunidades mientras se está trabajando.



Figura A.14: Área de Trabajo: campana de flujo laminar, a la derecha bandeja de descarte y algunos materiales antes de ser ingresados a la campana. IBE.



Figura A.15: *Campana de Flujo laminar instalada en el CDD, dentro de la cabina está una L plomada, termómetro digital, brazo mecánico, recipiente para desechos; y debajo están los viales, inyectadoras y demás implementos estériles necesarios para la dosificación.*

A.15. Medios Nutritivos y Suplementos

Los medios nutritivos son el entorno artificial que se les proporciona a los cultivos celulares para que crezcan y se desarrollen, todo esto se logra a través de la combinación de ciertos componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas. Estos medios por lo general se suplementan para complementar el valor nutritivo que ya poseen y así optimizarlo para el desarrollo celular.

A.15.1. Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute).

Es un medio de cultivo celular que fue desarrollado por Moore y otros en el Roswell Park Memorial Institute (Moore, Gerner, & Franklin, 1967) y de ahí su acrónimo, las células de la línea HT-29 fueron entregadas por el IVIC en este medio y luego se hicieron crecer en medio DMEM en el IBE, ya que este es el medio que se prepara en esta institución con mayor frecuencia.

RPMI-1640 Medium	
De	SIGMA
Catálogo	R-6504
Lote	110k83101
Con L-glutamina	10,4 g
Bicarbonato de sodio	—

Tabla A.4: Especificaciones del RPMI, SIGMA.

A.15.2. Medio nutritivo DMEM (Dulbelcco's Modified Eagle Medium).

Este medio básicamente es una modificación de un medio más simple: Eagle's minimal essential medium (EMEM). Tiene una concentración mayor de vitaminas y aminoácidos, de esta manera se puede cultivar diversidad celular con él.

DMEM	
De	SIGMA
Catálogo	d-5523
Lote	110k83101

Tabla A.5: *Especificaciones del DMEM, SIGMA..*

A.16. Etanol al 70 %

Es un compuesto químico con alto poder antiséptico y bactericida, se emplea a la concentración de 70% ya que es a este nivel que alcanza su mayor potencial bactericida.

A.17. Azul de tripano

Es un colorante que se emplea en histología para hacer tinciones, se le conoce como colorante de exclusión ya que cuando la célula es viable, es decir, está en perfectas condiciones, no permite que el colorante penetre en ella, mientras que

cuando ya no es viable la membrana pierde la selectividad que posee, el tinte pasa a través de ella y colorea la célula de azul.

A.18. Phosphate buffered saline (PBS)

Es una solución búfer salina fosfatada que se emplea para diluir medios nutritivos, particularmente en este trabajo se empleó como solución de lavado para poder agregar la enzima tripsina, ya que elimina todo rastro de Suero Fetal Bovino (SFB) y este último inhibe la acción de la enzima.

A.19. Enzima Tripsina EDTA

Es una proteína capaz de catalizar la disgregación celular, lo que constituye algo fundamental para hacer el conteo celular en las cámaras de Neubauer. Esta enzima se mantiene congelada a una temperatura de -20°C y se tempera antes de usarse. Se mantiene con las células por lapsos no mayores de cinco minutos en la incubadora ya que su poder de disgregación es tan alto que al exponer las células por largos períodos de tiempo rompe la membrana celular conllevando así a la muerte celular.

A.20. MTT y DMSO

El Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es un compuesto que se emplea para hacer ensayos de MTT, dicho ensayo se fundamenta en la

reacción que lleva a cabo la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa al reducir el compuesto y formar cristales de formazán (de color azul), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial y así la viabilidad celular ya que esta última es proporcional al número de cristales formados.

Se prepara la solución de MTT al 0,4 g/mL y una vez agregado el MTT en cada pozo, se incuba a 37 °C por dos horas.

Luego se procede a descartar el MTT. Una vez descartado, se agrega en cada pozo Dimetil Sulfoxido (DMSO) que es un solvente de ciertas sales, entre ellas los cristales de formazán. Cuando estén disueltos los cristales, las placas pueden leerse en un espectrofotómetro. A través de este ensayo sólo es posible determinar el número de células vivas, no proporciona información alguna sobre la población celular que no sobrevivió.

A.21. Cámara de Neubauer

Este instrumento también es conocido como hemocitómetro y se utiliza para realizar conteo celular en un medio líquido. Consiste en un portaobjetos que posee dos depresiones en cuyo fondo está tallada una cuadrícula de dimensiones conocidas, con un cubreobjetos se tapa la cámara y se introduce la suspensión celular que en nuestro caso había sido diluida con azul de tripano, en ambas depresiones es posible colocar la suspensión para aumentar



Figura A.16: Cámara de Neubauer, IBE.

el número de conteos y se observa a microscopio óptico. De acuerdo al número de células contado y el volumen total de suspensión disponible se calcula el número de células por unidad de volumen.

A.22. Microscopio invertido

Este equipo de observación cuenta con una disposición inversa de sus componentes en relación con un microscopio óptico convencional: tanto la fuente de luz como el condensador se encuentran encima de la plataforma apuntando hacia abajo y los objetivos se encuentran bajo la plataforma apuntando hacia arriba, sólo mantienen la misma ubicación los oculares.

Este instrumento ofrece la ventaja de poder observar muestras y cultivos sin tener que hacer ninguna preparación adicional, a diferencia de los tradicionales en los que se debe colocar la muestra en un portaobjetos y extraerlo de su medio. De esta manera, puede hacerse un seguimiento al cultivo y observar su evolución sin tener que alterarlo para ello.

A.23. Micropipetas de volumen variable

Son instrumentos que permiten medir pequeños volúmenes, estos pueden ir desde 1 μL hasta 1 mL o más, ajustando en su parte superior el valor a tomar y a los que se les incorpora en su extremo inferior puntas desechables que se ajustan a dicho extremo, en las puntas es donde queda almacenado el volumen a medir, la punta se sumerge en el líquido y al pulsar un botón este es recogido. Para la realiza-

ción de este trabajo se emplearon micropipetas de diferentes rangos de operación.

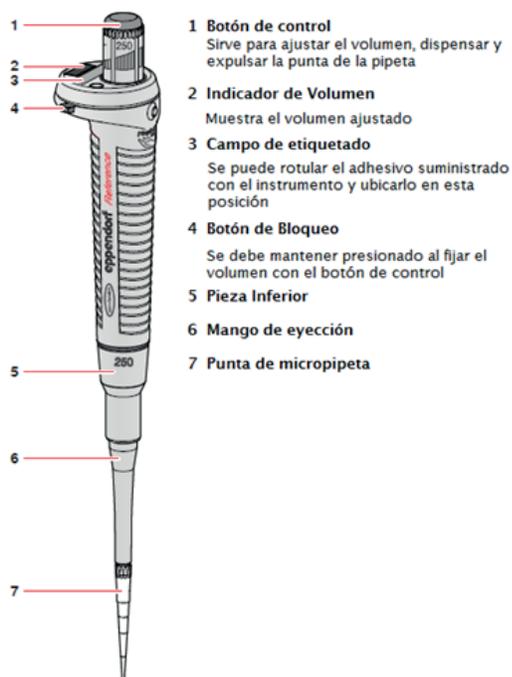


Figura A.18: *Imagen explicativa de los componentes de las micropipetas Eppendorf® Series 2000.*

A.24. Puntas

Debido a lo importante que es mantener la esterilidad en cuanto a cultivos celulares se refiere, las puntas son descartables y se colocan en la micropipeta bajo la campana de flujo laminar cuidando de no tocar con ellas ningún otro objeto que no sea el volumen a medir, si accidentalmente se tropieza algo con ella debe desecharse inmediatamente sin usarla en el cultivo.



Figura A.19: Puntas de Micropipeta.

A.25. Pipeteador automático

Instrumento que permite controlar a través de dos botones el llenado y vaciado de las pipetas graduadas.

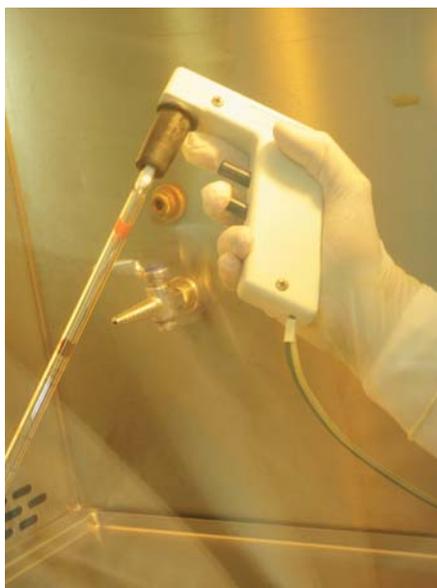


Figura A.20: Pipeteador Automático Disponible en el IBE

A.26. Piceta

Es un instrumento de laboratorio que se utiliza para almacenar el agua destilada, su estructura consta de un recipiente (de diversos tamaños) que puede ser fácilmente transportado de un lugar a otro del laboratorio y una boquilla con forma de pitillo por el cual sale el agua destilada al ejercer presión en el recipiente.



Figura A.21: Piceta.

A.27. Baño termostatzado de agua (Baño María)

Equipo de acero inoxidable que lleva cierto volumen de agua en su interior para temperar las soluciones a emplear en los cultivos celulares, ya que la mayoría de ellas se conservan refrigeradas o inclusive congeladas, así que se colocan en Baño María a 37°C para poder utilizarse.



Figura A.22: *Baño Termostatzado, IBE.*

A.28. Centrifuga

Equipo en el que se colocan los tubos con suspensión celular para que las células se depositen en el fondo y hacer el conteo celular.

A.29. Viales

Recipiente de vidrio estéril en el que se depositó el FDG y se diluyó para la realización de los experimentos.

A.30. Inyectoras

Instrumento estéril utilizado para tomar el volumen de FDG necesario para cada fase del trabajo.

A.30.1. Balanzas



Figura A.23: *Balanzas empleadas en los experimentos, IBE.*

A.31. Espectrofotómetro

Este equipo puede proporcionar rápidamente medidas de diferentes muestras en una placa de cultivo. Se debe seleccionar la longitud de onda para la lectura, en el caso de los ensayos con MTT trabaja en el rango de 540-570 nm.

Cuenta con un sistema óptico que lleva la luz hasta los pozos de la placa, donde se encuentra la muestra bajo análisis. La luz que atraviesa la muestra tiene un diámetro que varía entre 1 y 3 mm. El sistema de detección recibe la energía lumínica, proveniente de la muestra, la amplifica, determina la absorbancia y, a través de un sistema de lectura, la convierte en datos que permiten interpretar el resultado de la prueba.

Se trabajó con dos espectrofotómetros para la lectura de las diferentes placas empleadas:

- Tecan GENios Microplate Reader.(Figura A.24b)
- Stat Fax® 2100 Microplate Reader. (Figura A.24a)



(a) Espectrofotómetro del Laboratorio de Productos Naturales, UCV



(b) Espectrofotómetro del Laboratorio de Patología Molecular, IVIC

Figura A.24: Espectrofotómetros que se utilizaron en el presente trabajo.

A.32. Activímetro

Es un instrumento que permite conocer la actividad de un radiofármaco. Está conformado por una cámara de ionización gaseosa tipo pozo dentro de la cual se introduce el material cuya actividad se desea medir. La actividad es medida en función de la corriente de ionización producida por las radiaciones emitidas por el radioisótopo que interactúa con el gas. La cámara se sella, usualmente bajo presión, y tiene dos electrodos cilíndricos coaxiales que se mantienen a una diferencia de potencial; el espacio axial constituye el pozo. En el electrómetro asociado la diferencia de potencial se convierte en una señal de voltaje que se amplifica, se procesa y finalmente se presenta, generalmente en forma digital, en forma de unidades de actividad (Bq o Ci), en este caso Ci. Esto es posible dado que para un determinado radionúclido, suponiendo una geometría fija y una respuesta lineal, la corriente de

ionización es directamente proporcional a la actividad. Sin embargo, la respuesta de una cámara de ionización a diferentes radionúclidos varía de acuerdo a sus energías. Por lo tanto, se necesita ajustar apropiadamente la señal para el tipo de radioisótopos que se mide; esto se logra colocando en el activímetro selectores de isótopos.

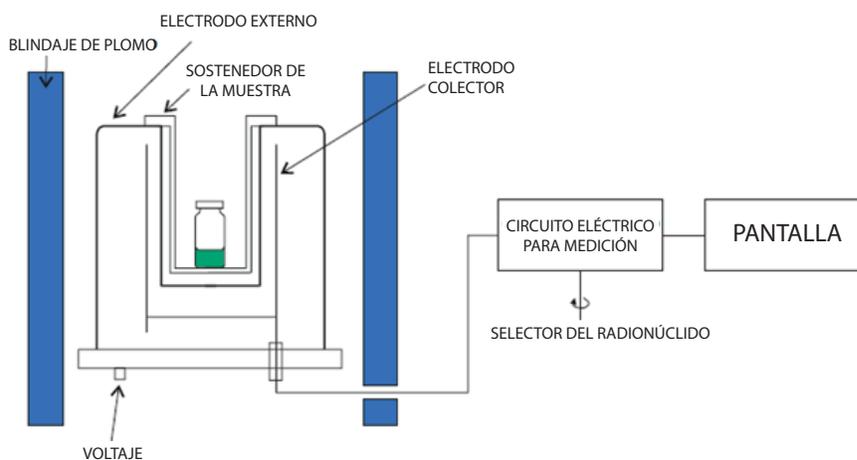


Figura A.25: Diseño Activímetro



Figura A.26: Activímetro ubicado en el CDD

A.33. Dosímetro Personal

Para llevar control de la exposición, se contó con un dosímetro personal de lectura inmediata.



Figura A.27: Dosímetro, IBE.

A.34. Sistema MINITRACE GE

Este equipo se encuentra en el Centro Diagnóstico Docente Las Mercedes, y en él se produce el ^{18}F para luego sintetizar FDG. Consta de un ciclotrón que está conectado a dos módulos sintetizadores y a una estación computarizada de trabajo desde donde se dirige todo el proceso.

PREPARACIÓN DE MEDIO NUTRITIVO

B.1. DMEM

B.1.1. Para 1L DMEM (medio base)

- 1L de H₂O bidestilada y desionizada
- 3,7 g de bicarbonato de sodio
- 1 frasco de DMEM
- 10% de glutamina

B.1.2. Para 100 mL

- 88,5 mL de DMEM (medio base)
- 10 mL de Suero Fetal de Bovino (SFB 10%)
- 1 mL de antibiótico (1%)
- 0,5 mL de glutamina (1%)

CÁLCULOS PRIMERA FASE

C.1. Línea 3T3

$$D_c/mL = 24 \times 2 \times 10^4 = 4,8 \times 10^5 \text{ cél}/mL$$

⇒ en 5 mL tenemos:

$$4,8 \times 10^5 \text{ cél}/mL \times 5 \text{ mL} = 2,4 \times 10^6 \text{ cél}$$

DENSIDAD: 20.000 Células/pozo

Cálculo de células necesarias:

$$2 \text{ placas} \times 24 \text{ pozos} = 48 \text{ pozos}$$

$$\Rightarrow 20,000 \text{ cél} \times 48 \text{ pozos} = 960,000 \text{ cél}$$

Cálculo de la alícuota a tomar:

$$2.400.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad 5 \text{ mL}$$

$$960.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad x$$

$$\Rightarrow x = 2 \text{ mL}$$

Volumen total a preparar:

$$0,5 \text{ mL/pozo} \times 48 \text{ pozos} = 24 \text{ mL}$$

DENSIDAD: 30.000 Células/pozo

Cálculo de células necesarias:

$$2 \text{ placas} \times 24 \text{ pozos} = 48 \text{ pozos}$$

$$\Rightarrow 30,000 \text{ cél} \times 48 \text{ pozos} = 1,440,000 \text{ cél}$$

Cálculo de la alícuota a tomar:

$$2.400.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad 5 \text{ mL}$$

$$1.440.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad x$$

$$\Rightarrow x = 3 \text{ mL}$$

Volumen total a preparar:

$$0,5 \text{ mL/pozo} \times 48 \text{ pozos} = 24 \text{ mL}$$

Volumen necesario de medio nutritivo**DMEM a tomar:**

$$24 \text{ mL} - 2 \text{ mL} = 22 \text{ mL}$$

Volumen necesario de medio nutritivo**DMEM a tomar:**

$$24 \text{ mL} - 3 \text{ mL} = 21 \text{ mL}$$

C.2. Línea HT-29

$$D_c / \text{mL} = 194,5 \times 2 \times 10^4 = 3,89 \times 10^6 \text{ cél/mL}$$

⇒ en 8 mL tenemos:

$$3,89 \times 10^6 \text{ cél/mL} \times 8 \text{ mL} = 3,112 \times 10^7 \text{ cél}$$

DENSIDAD: 20.000 Células/pozo

Cálculo de células necesarias:

$$2 \text{ placas} \times 24 \text{ pozos} = 48 \text{ pozos}$$

$$\Rightarrow 20,000 \text{ cél} \times 48 \text{ pozos} = 960,000 \text{ cél}$$

Cálculo de la alícuota a tomar:

$$31.120.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad 8 \text{ mL}$$

$$960.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad x$$

$$\Rightarrow x \cong 0,247 \text{ mL}$$

Volumen total a preparar:

$$0,5 \text{ mL/pozo} \times 48 \text{ pozos} = 24 \text{ mL}$$

Volumen necesario de medio nutritivo**DMEM a tomar:**

$$24 \text{ mL} - 0,247 \text{ mL} = 23,753 \text{ mL}$$

DENSIDAD: 30.000 Células/pozo

Cálculo de células necesarias:

$$2 \text{ placas} \times 24 \text{ pozos} = 48 \text{ pozos}$$

$$\Rightarrow 30,000 \text{ cél} \times 48 \text{ pozos} = 1,440,000 \text{ cél}$$

Cálculo de la alícuota a tomar:

$$31.120.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad 8 \text{ mL}$$

$$1.440.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad x$$

$$\Rightarrow x \cong 0,370 \text{ mL}$$

Volumen total a preparar:

$$0,5 \text{ mL/pozo} \times 48 \text{ pozos} = 24 \text{ mL}$$

Volumen necesario de medio nutritivo**DMEM a tomar:**

$$24 \text{ mL} - 0,370 \text{ mL} = 23,630 \text{ mL}$$

Luego del incidente de obstrucción con la pipeta fue necesario repetir los cálculos:

$$D_c/mL = 24 \times 2 \times 10^4 = 4,8 \times 10^5 \text{ cél}/mL$$

⇒ en 4 mL tenemos:

$$3,89 \times 10^6 \text{ cél}/mL \times 4 \text{ mL} = 10,32 \times 10^6 \text{ cél}$$

DENSIDAD: 20.000 Células/pozo

Cálculo de células necesarias:

$$2 \text{ placas} \times 24 \text{ pozos} = 48 \text{ pozos}$$

$$\Rightarrow 20,000 \text{ cél} \times 48 \text{ pozos} = 960,000 \text{ cél}$$

Cálculo de la alícuota a tomar:

$$10.320.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad 4 \text{ mL}$$

$$960.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad x$$

$$\Rightarrow x \cong 0,372 \text{ mL}$$

Volumen total a preparar:

$$0,5 \text{ mL/pozo} \times 48 \text{ pozos} = 24 \text{ mL}$$

Volumen necesario de medio nutritivo

DMEM a tomar:

$$24 \text{ mL} - 0,372 \text{ mL} = 23,628 \text{ mL}$$

DENSIDAD: 30.000 Células/pozo

Cálculo de células necesarias:

$$2 \text{ placas} \times 24 \text{ pozos} = 48 \text{ pozos}$$

$$\Rightarrow 30,000 \text{ cél} \times 48 \text{ pozos} = 1,440,000 \text{ cél}$$

Cálculo de la alícuota a tomar:

$$10.320.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad 4 \text{ mL}$$

$$1.440.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad x$$

$$\Rightarrow x \cong 0,558 \text{ mL}$$

Volumen total a preparar:

$$0,5 \text{ mL/pozo} \times 48 \text{ pozos} = 24 \text{ mL}$$

Volumen necesario de medio nutritivo

DMEM a tomar:

$$24 \text{ mL} - 0,558 \text{ mL} = 23,442 \text{ mL}$$

Cálculo para el faltante

$$10.320.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad 4 \text{ mL}$$

$$x \quad \text{—} \quad 3,07 \text{ mL}$$

$$\Rightarrow x \cong 7,920,600 \text{ cél}$$

DENSIDAD: 20.000 Células/pozo**Cálculo de células necesarias:**

$$2 \text{ placas} \times 24 \text{ pozos} = 48 \text{ pozos}$$

$$\Rightarrow 20,000 \text{ cél} \times 48 \text{ pozos} = 960,000 \text{ cél}$$

Cálculo de la alícuota a tomar:

$$\begin{array}{rcl} 7.920.000 \text{ cél} & \text{---} & 5 \text{ mL} \\ 280.000 \text{ cél} & \text{---} & x \end{array}$$

$$\Rightarrow x \cong 0,109 \text{ mL}$$

Volumen total a preparar:

$$0,5 \text{ mL/pozo} \times 14 \text{ pozos} = 7 \text{ mL}$$

Volumen necesario de medio nutritivo**DMEM a tomar:**

$$7 \text{ mL} - 0,109 \text{ mL} = 6,891 \text{ mL}$$

DENSIDAD: 30.000 Células/pozo**Cálculo de células necesarias:**

$$2 \text{ placas} \times 24 \text{ pozos} = 48 \text{ pozos}$$

$$\Rightarrow 30,000 \text{ cél} \times 14 \text{ pozos} = 420,000 \text{ cél}$$

Cálculo de la alícuota a tomar:

$$\begin{array}{rcl} 7.920.000 \text{ cél} & \text{---} & 5 \text{ mL} \\ 420.000 \text{ cél} & \text{---} & x \end{array}$$

$$\Rightarrow x = 0,163 \text{ mL}$$

Volumen total a preparar:

$$0,5 \text{ mL/pozo} \times 14 \text{ pozos} = 7 \text{ mL}$$

Volumen necesario de medio nutritivo**DMEM a tomar:**

$$14 \text{ mL} - 0,163 \text{ mL} = 6,837 \text{ mL}$$

CÁLCULOS SEGUNDA FASE

$$D_c/mL = 72,5 \times 2 \times 10^4 = 1,45 \times 10^6 \text{ cél}/mL$$

⇒ en 2,5 mL tenemos:

$$1,45 \times 10^6 \text{ cél}/mL \times 2,5 \text{ mL} = 3,625 \times 10^6 \text{ cél}$$

DENSIDAD: 2.000 Células/pozo

Cálculo de células necesarias:

$$5 \text{ placas} \times 24 \text{ pozos} = 120 \text{ pozos}$$

$$\Rightarrow 2,000 \text{ cél} \times 120 \text{ pozos} = 240,000 \text{ cél}$$

Cálculo de la alícuota a tomar:

$$3.625.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad 2,5 \text{ mL}$$

$$240.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad x$$

$$\Rightarrow x \cong 0,167 \text{ mL}$$

Volumen total a preparar:

$$0,5 \text{ mL/pozo} \times 120 \text{ pozos} = 60 \text{ mL}$$

Volumen necesario de medio nutritivo

DMEM a tomar:

$$60 \text{ mL} - 0,167 \text{ mL} = 59,833 \text{ mL}$$

DENSIDAD: 3.000 Células/pozo

Cálculo de células necesarias:

$$5 \text{ placas} \times 24 \text{ pozos} = 120 \text{ pozos}$$

$$\Rightarrow 3,000 \text{ cél} \times 120 \text{ pozos} = 360,000 \text{ cél}$$

Cálculo de la alícuota a tomar:

$$3.625.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad 2,5 \text{ mL}$$

$$360.000 \text{ cél} \quad \text{—} \quad x$$

$$\Rightarrow x \cong 0,248 \text{ mL}$$

Volumen total a preparar:

$$0,5 \text{ mL/pozo} \times 120 \text{ pozos} = 60 \text{ mL}$$

Volumen necesario de medio nutritivo

DMEM a tomar:

$$60 \text{ mL} - 0,248 \text{ mL} = 59,752 \text{ mL}$$

REFERENCIAS

- [1] *MINItrace™ REFERENCE MANUAL. A Training in Partnership Program.* GE Medical Systems, Uppsala, 2004.
- [2] CHEN, S.; ZHAO, Y.; HAN, W.; CHIU, S. K.; ZHU, L.; WU, L. et YU, K. N.: « Rescue effects in radiobiology: unirradiated bystander cells assist irradiated cells through intercellular signal feedback. » *Mutat Res*, 2010, **706(1-2)**, pp. 59–64.
- [3] CLARIDGE MACKONIS, E.; SUCHOWERSKA, N.; ZHANG, M.; EBERT, M.; MCKENZIE, DR et JACKSON, M.: « Cellular response to modulated radiation fields ». *Physics in Medicine and Biology*, 2007, **52**, p. 5469.
- [4] DERETIC, V.: *Autophagy in immunity and infection: a novel immune effector.* Wiley, Weinheim, 2006.
- [5] ESTORCH, M.; CARRIÓ, I. et P, GONZÁLEZ: *Medicina nuclear: aplicaciones clínicas.* Masson, 2003.
- [6] HALL, E.J.: « The bystander effect ». *Health physics*, 2003, **85(1)**, p. 31.
- [7] HALL, E.J. et GIACCIA, A.J.: *Radiobiology for the radiologist.* Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [8] HALL, E.J. et HEI, T.K.: « Genomic instability and bystander effects induced by

- high-LET radiation ». *Oncogene*, 2003, **22(45)**, pp. 7034–7042.
- [9] HELGASON, C.D. et MILLER, C.L.: *Basic cell culture protocols*. Methods in molecular biology. Humana Press, 2005.
- [10] KHAN, F.M.: *The physics of radiation therapy*. Doody's all reviewed collection. Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
- [11] KOGEL, A. et JOINER, M.: *Basic Clinical Radiobiology*. A Hodder Arnold Publication. Hodder Arnold, 2009.
- [12] KOTURBASH, I.; BOYKO, A.; RODRIGUEZ-JUAREZ, R.; McDONALD, R.J.; TRYNDYAK, V.P.; KOVALCHUK, I.; POGRIBNY, I.P. et KOVALCHUK, O.: « Role of epigenetic effectors in maintenance of the long-term persistent bystander effect in spleen in vivo ». *Carcinogenesis*, 2007, **28(8)**, p. 1831.
- [13] KOTURBASH, I.; ZEMP, F.J.; KUTANZI, K.; LUZHNA, L.; LOREE, J.; KOLB, B. et KOVALCHUK, O.: « Sex-specific microRNAome deregulation in the shielded bystander spleen of cranially exposed mice ». *Cell cycle*, 2008, **7(11)**, pp. 1658–1667.
- [14] LANGDON, S.P.: *Cancer cell culture: methods and protocols*. Methods in molecular medicine. Humana Press, 2004.
- [15] MAYLES, P.; NAHUM, A.E. et ROSENWALD, J.C.: *Handbook of radiotherapy physics: theory and practice*. Taylor & Francis, 2007.
- [16] MOTHERSILL, C. et SEYMOUR, CB: « Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium ». *Radiation Research*, 1998, **149(3)**, pp. 256–262.

- [17] NAGASAWA, H. et LITTLE, J.B.: « Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of α -particles ». *Cancer Research*, 1992, **52(22)**, p. 6394.
- [18] POTTEN, C.S.: *Stem cells*. Academic Press, 1997.
- [19] POWSNER, R.A. et POWSNER, E.R.: *Essential nuclear medicine physics*. Wiley-Blackwell, 2006.
- [20] SAWANT, S. G.; ZHENG, W.; HOPKINS, K. M.; RANDERS-PEHRSON, G.; LIEBERMAN, H. B. et HALL, E. J.: « The radiation-induced bystander effect for clonogenic survival. » *Radiation Research*, 2002, **157(4)**, pp. 361–364.
- [21] STEEL, G.G.: *Basic clinical radiobiology*. Arnold New York: Oxford University Press, London, 1997.
- [22] TUBIANA, M.; DUTREIX, J. et WAMBERSIE, A.: *Introduction to radiobiology*. Taylor & Francis, 1990.