



POLITÉCNICA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA

AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA - BIOLOGÍA VEGETAL

Estudio in vitro de la supervivencia de células tumorales irradiadas con rayos X

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor: Carlos Manzano Basalo

Tutor: Miguel Ángel Morcillo Alonso

Cotutor: Pablo González-Melendi de León

Junio de 2019



POLITÉCNICA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE
BIOSISTEMAS**

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

**ENSAYO *IN VITRO* DE LA SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS TUMORALES IRRADIADAS CON
RAYOS X**

TRABAJO FIN DE GRADO

Carlos Manzano Basalo

MADRID,

2019

**Director: Miguel Ángel Morcillo Alonso
Jefe de la Unidad de Aplicaciones Biomédicas de Radioisótopos y Farmacocinética
Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas
(CIEMAT)**



POLITÉCNICA



**TÍTULO DEL TFG: ENSAYO *IN VITRO* DE LA SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS
TUMORALES IRRADIADAS CON RAYOS X**

**Memoria presentada por Carlos Manzano Basalo para la obtención del título de
Graduado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Madrid**

Fdo. Carlos Manzano Basalo

VºBº Tutor y director del TFG

D. Miguel Ángel Morcillo Alonso

Jefe de la Unidad de Aplicaciones Biomédicas de Radioisótopos y Farmacocinética

Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT)

VºBº Cotutor del TFG

D. Pablo González-Melendi de León

Catedrático de Universidad

Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal

ETSI Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas – Universidad Politécnica de Madrid

25 de junio de 2019

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que debo agradecer el haber finalizado este proyecto y en general el grado en Biotecnología.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi tutor Miguel Ángel Morcillo Alonso por haber depositado su confianza en mí y haberme dado la oportunidad de formar parte de un equipo maravilloso en el CIEMAT durante estos meses, donde he podido poner en práctica lo aprendido en el grado y desarrollarme como profesional. Su labor como tutor ha sido excelente.

También quiero dar las gracias a “las Martas” por haberme hecho todo un maestro de los cultivos celulares.

A Marta Ibáñez Moragues, por tu infinita paciencia (porque sí que tienes aunque digas lo contrario), por tus consejos, por tus sesiones musicales en el laboratorio de cultivos y por tu ayuda incondicional. Tu optimismo y apoyo han sido imprescindibles para sacar adelante este trabajo. Mil gracias.

A Marta Oteo Vives, por toda la ayuda prestada, por todos los consejos que me has aportado y por tu sentido del humor que tan buenos momentos ha dado. Tu pasión por la ciencia es verdaderamente inspiradora.

A mis dos farmacéuticos favoritos Natalia y Fernando, a Vicente, a Alfonso, a Eduardo y a los demás trabajadores de la Unidad y de la IR-08, por acompañarme en esta etapa tan enriquecedora y por acogerme con tanto cariño en vuestro equipo.

A mis padres y a mi hermano, sin los que esto hubiese sido imposible. A mi madre, por ser incondicional, por aguantarme y calmarme en mis peores momentos y por quererme igual. A mi padre por el apoyo y el cariño que me das. Haber terminado esta carrera es mérito tanto mío como vuestro.

A mis amigos, a mis “Alsaimars”, a Andrea y a Sergio. Habéis sido un gran apoyo estos años y no puedo más que daros las gracias por seguir a mi lado, por haberme dado tan buenos momentos y por quererme tan bien.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ensayo de clonogenicidad: Valores medios de la SF y su desviación estándar para cada dosis de radiación.....	19
Tabla 2. Ensayo de clonogenicidad: Parámetros α y β del modelo LQ	19
Tabla 3. Test ANOVA para el área media de las colonias.....	21
Tabla 4. Test de comparaciones múltiples por Dunnett para el área de las colonias en A-549.....	21
Tabla 5. Test ANOVA del ensayo de actividad metabólica celular por MTT.....	22
Tabla 6. Comparación múltiple por Dunnett centrada en la variable Tiempo.....	23
Tabla 7. Comparación múltiple por Dunnett centrada en la variable Dosis.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectro electromagnético.....	1
Figura 2. Distribución de dosis en función de la profundidad del tejido.....	7
Figura 3. Modelo LQ en escala logarítmica.....	9
Figura 4. Fundamento de un ensayo de clonogenicidad.....	12
Figura 5. Ensayo de supervivencia celular.....	20
Figura 6. Ensayo de actividad metabólica celular por MTT.....	22

ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

CE: Captura electrónica

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS: Suero fetal bovino

ICRU: Comisión Nacional de Unidades y Medidas Radiológicas

LET: Transferencia lineal de energía

LINAC: acelerador lineal

LQ: Modelo lineal-cuadrático

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

PBS: Tampón fosfato salino

PE: Eficiencia de plaqueo

RBE: Eficacia biológica relativa

SF: Fracción de supervivencia

LISTA DE SÍMBOLOS

°C: Grados Celsius

D: Dosis de radiación recibida

Gy: Gray

Rad: rad

ABSTRACT

Radiobiology is a field that involves the study of the effects that ionizing radiations produce in biological material. This interaction can be applied in clinic by radiotherapy, which is one of the most important current therapies in oncology along with the chemotherapy and surgery. Conventional radiotherapy, based on photons and electrons, is widely used to reduce tumors growth, which varies regarding to their radiosensitivity. Depending on tumor's location, radiation may affect to healthy tissue surrounding the affected area. Currently, the peak of protontherapy as a type of radiotherapy that uses protons, brings more control in dosage administration by leading the protons straightforward to the tumor so, the healthy tissue affected by radiation around the tumor decreases.

The aim of this project is to evaluate the effects after irradiation with X rays in two cancer cell lines (A-549 and U-251). For this purpose, both survival rate and viability of cells will be studied under different radiation dosage by performing clonogenic assays and MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assays. The results will be used to build a solid reference for upcoming studies in protontherapy. This reference will be helpful to choose the most effective radiotherapy treatment after obtaining the RBE (Relative Biological Effectiveness) parameter, which establishes a direct relationship between conventional radiotherapy and protontherapy.

RESUMEN

La radiobiología estudia los efectos de la interacción entre la radiación ionizante y la materia biológica viva. Esta interacción tiene aplicación clínica en la radioterapia, la cual conforma uno de los tres pilares clave en el tratamiento oncológico junto a la quimioterapia y la cirugía. La radioterapia convencional, que emplea fotones y electrones, se utiliza para controlar el crecimiento de diferentes tipos de tumores, variables respecto a su "radiosensibilidad" y que, dependiendo de su localización anatómica, el tejido sano adyacente se ve afectado. Actualmente una técnica de radioterapia en auge es la protonterapia, que emplea protones y permite un mayor control de las dosis suministradas siendo éstas más dirigidas, de manera que se reduce la dosis de radiación depositada en el tejido sano circundante al tumor.

El objetivo del proyecto será evaluar los efectos de la irradiación con rayos X en dos líneas de células tumorales (A-549 y U-251), estudiando cómo varía la supervivencia y viabilidad celular respecto a diferentes dosis de radiación. Para ello se recurrirá a estudios de clonogenicidad y ensayos de actividad metabólica celular por reducción del compuesto MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio). Los resultados del trabajo proporcionarán una base comparativa frente a futuros estudios con protonterapia ya que facilitarán la elección del tratamiento más adecuado para cada tipo tumoral mediante el cálculo de la RBE (Relative Biological Effectiveness), el cual permitirá obtener una relación directa entre la radioterapia convencional y la radioterapia con protones.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1. Radiactividad y radiaciones ionizantes.....	1
2. Efectos biológicos de las radiaciones ionizantes.....	3
3. Radioterapia y protonterapia como tratamiento oncológico.....	6
4. Ensayos de clonogenicidad.....	11
5. Ensayos MTT.....	13
6. Objetivos.....	14
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
1. Cultivo de líneas celulares.....	15
2. Estudios funcionales.....	15
2.1. Ensayos de supervivencia celular.....	15
2.2. Ensayos de actividad metabólica celular por MTT.....	17
3. Análisis estadístico.....	17
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	19
1. Ensayos de clonogenicidad.....	19
2. Ensayos de actividad metabólica celular por MTT.....	22
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	24
1. Discusión de los resultados.....	24
2. Conclusiones.....	26
CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA.....	27
APÉNDICES.....	a
1. APÉNDICE 1: Esquema del procedimiento general de los ensayos de clonogenicidad y MTT.....	a

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.- RADIATIVIDAD Y RADIACIONES IONIZANTES

La radiactividad es el fenómeno por el cual núcleos atómicos inestables emiten energía a través de la liberación espontánea de radiación, partículas o de ambas para estabilizarse. Dentro de las radiaciones que pueden liberarse durante el proceso, encontramos las radiaciones electromagnéticas, que presentan carácter ondulatorio y corpuscular en su propagación, lo cual es fundamental para comprender su interacción con la materia y los fenómenos de refracción, interferencia, polarización e intercambio de energía que se producen.

Englobadas por las radiaciones electromagnéticas (Figura 1), se encuentran las radiaciones ionizantes. En los procesos radiactivos en los que se emiten partículas cargadas (radiactividad α y radiactividad β), el núcleo residual es de una especie nuclear diferente al núcleo original. En los procesos en los que solo se produce radiación electromagnética (radiactividad γ y rayos X), el núcleo residual pertenece a la misma especie nuclear que el núcleo original. Las radiaciones ionizantes cuentan con la energía suficiente para que, durante su interacción con los átomos que componen la materia, puedan cargarlos o ionizarlos al desplazar electrones de sus orbitales atómicos (Morcillo M.A., 2018).

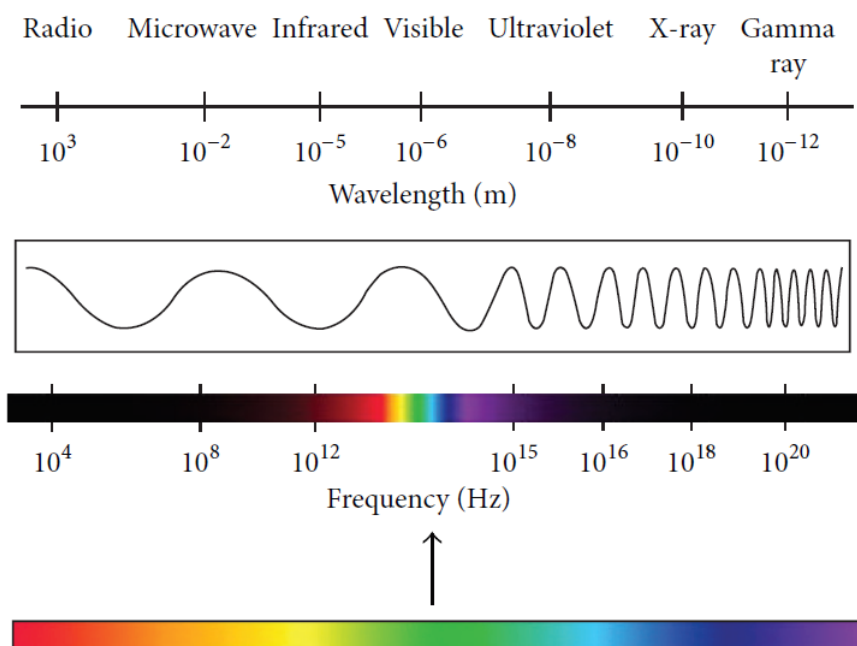


Figura 1: Espectro electromagnético. Las radiaciones ionizantes presentan longitudes de onda inferiores a 10^{-8} m y frecuencias superiores a $3 \cdot 10^{15}$ Hz (Lewicka K. *et al.*, 2015)

Respecto a la radiación emitida, podemos encontrar tres tipos principales de procesos radiactivos: desintegración α , desintegración β y desintegración γ . Las desintegraciones α se corresponden con radionucleidos de núcleos pesados con número másico (A) superior a 140 y ocurren fruto de la repulsión

eléctrica entre protones en el núcleo atómico. Las partículas resultantes se liberan con una energía determinada del radionucleido siguiendo un espectro discreto (Friedlander, G. *et al.*, 1981).

Las desintegraciones β son propias de radionucleidos que alteran el valor de su número atómico (Z) pero no su A , y pueden dividirse en dos subtipos de desintegraciones (Elias, H. *et al.*, 1982): la desintegración β^- emite un electrón mientras que la desintegración β^+ emite un positrón. Respecto a la desintegración β^- , se da en radionucleidos que presentan grandes cantidades de neutrones, donde el núcleo original se transforma en un núcleo distinto con igual número másico A pero con una unidad más de número atómico Z . El espectro energético de los electrones que se emiten en este subtipo de desintegraciones β es continuo, es decir, los electrones que se emiten muestran una distribución continua de energía desde cero hasta una energía máxima característica del radionucleido emisor. La desintegración β^+ se caracteriza por núcleos atómicos que emiten positrones, la antipartícula del electrón, que presentan la misma masa, pero carga positiva. Este tipo de desintegraciones son resultado de la conversión de un protón del núcleo atómico en un neutrón, emitiendo un positrón y un neutrino. El núcleo resultante presentará el mismo número másico A que el núcleo original, pero con el número atómico una unidad menor.

Las desintegraciones γ implican a un núcleo excitado que pasa a un estado de menor energía emitiendo radiación electromagnética. Esto suele ocurrir en radionucleidos que han experimentado una desintegración α o β debido a que es probable que permanezcan en estado excitado y requieran la liberación de un fotón para volver al equilibrio. Los radioisótopos que emiten positrones pueden considerarse en la práctica como emisores de radiación γ , porque los positrones son partículas inestables capaces de interactuar con electrones de átomos circundantes induciendo la aniquilación de ambas partículas y transformándose la masa en energía formando dos fotones γ .

Podemos encontrar también fenómenos de captura electrónica (CE). En estos casos, el núcleo de un radionucleido captura un electrón convirtiendo un protón del núcleo en un neutrino y un neutrón. El núcleo resultante presenta el mismo número de nucleones (A) que el núcleo original, pero su número atómico Z disminuye en una unidad por lo que el resultado final es similar al que se obtiene de una desintegración de tipo β^+ . Es habitual que el radionucleido resultante de un fenómeno de captura electrónica se encuentre emitiendo fotones γ de diferentes energías antes de estabilizarse (Elias, H. *et al.*, 1982).

En su interacción con la materia, las radiaciones electromagnéticas son capaces de ceder energía a pequeños grupos de átomos mediante distintos fenómenos físicos. Como resultado, se liberan electrones potencialmente capaces de producir la ionización de átomos colindantes. Los principales fenómenos físicos implicados en este proceso son el efecto Fotoeléctrico, el efecto Compton y el efecto de Creación de pares.

El efecto Fotoeléctrico consiste en la absorción del fotón procedente de la radiación electromagnética de manera que toda su energía se transfiere a un electrón del átomo donde incide, liberándose con una energía igual a la diferencia entre la energía del fotón incidente y la de ligadura al átomo. El átomo resultante, con un electrón menos en la capa interna, emitirá radiación electromagnética cuando otro electrón del mismo átomo ocupe el espacio del electrón que se ha liberado.

Respecto al efecto Compton, es un fenómeno caracterizado por la transferencia parcial de energía por parte de un fotón a un electrón con el que interacciona, convirtiéndose en otro fotón de menor energía y desviándose de la trayectoria original. Este fenómeno físico es más habitual en electrones situados en las capas más externas del átomo.

En el caso de la Creación de pares, un fotón γ se convierte en un electrón y en un positrón a medida que se acerca al núcleo de un átomo en el que incide. Se trata de una conversión de energía en materia, de manera que la suma de las masas del positrón y del electrón tendrá que ser la energía mínima del fotón incidente para que pueda ocurrir la creación de pares.

Cuando un haz de fotones incide sobre la materia, la probabilidad de que ocurra un fenómeno u otro dependerá de la energía de los fotones y de la composición de la sustancia atravesada. En resumidas cuentas, el efecto Fotoeléctrico es el de mayor relevancia en eventos de absorción de fotones de baja energía (menos de 50 KeV); el efecto Compton, es más habitual en la absorción de fotones X o γ de energía intermedia (entre 100 KeV y 10 MeV) y finalmente, el efecto de creación de pares predomina a energías altas (mínimo 1.02 MeV).

Los fenómenos descritos que ocurren durante la interacción de la radiación con la materia implican la transferencia de energía de la radiación al medio en un tiempo del orden de 10^{-16} segundos. Esta energía se distribuye de formas diversas dependiendo del tipo y de la energía de la fuente de radiación, así como de la densidad del material sobre el que incide. El promedio de energía transferido por una radiación por unidad de trayectoria (keV/ μm) o, transferencia lineal de energía (LET), define la dosis absorbida (J/kg: Gray o Rads) por el medio en el transcurso de la partícula radiactiva que lo atraviesa. Este parámetro junto a la micro distribución de la energía en el espacio y tiempo, son los factores determinantes de la inducción de efectos biológicos en la materia viva (Sanz E. R., 2018). Se profundizará en el concepto del parámetro LET en el apartado 3 del capítulo 1 (página 6).

2.- EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES

Los seres vivos durante su vida permanecen expuestos a diferentes tipos de radiaciones ionizantes procedentes tanto de fuentes externas, como de compuestos emisores de radiactividad depositados en el interior de su organismo. Estas radiaciones pueden proceder de dos tipos de fuentes, la artificial y la natural. De las dosis de radiaciones ionizantes que recibimos los seres vivos, aproximadamente el 87% proviene de fuentes naturales (compuestos radiactivos de la corteza terrestre, rayos cósmicos, etc.)

mientras que el 13% restante tiene su origen en fuentes artificiales (medicina, investigación, industria, producción de energía eléctrica, etc.). Los efectos que producen este tipo de radiaciones ionizantes se deben principalmente a sus características y a su comportamiento físico. En la célula, el efecto de estas radiaciones puede ser directo o indirecto según el lugar de interacción.

Hablamos de acción indirecta cuando la absorción de la radiación ionizante ocurre en el medio donde están suspendidas las macromoléculas, normalmente agua. La absorción de la radiación por una molécula de agua induce la radiolisis, un fenómeno por el cual se genera un radical libre y un ion. Los iones resultantes suelen fusionarse a otros iones del medio para formar otras moléculas de agua, mientras que los radicales libres son altamente reactivos y tienen capacidad de disociar enlaces químicos y de inducir daños en diversas localizaciones celulares.

Por otro lado, la acción directa ocurre cuando la radiación es absorbida por macromoléculas de origen biológico como proteínas, ARN, ADN, etc. El resultado de esta interacción es la ionización de la macromolécula, derivando en la adquisición de conformaciones estructurales anormales que alteran la funcionalidad de la molécula afectada.

Actualmente no es posible distinguir debidamente si la interacción de la radiación con una macromolécula es el resultado de un efecto directo o indirecto, pero, debido a que el organismo humano presenta cerca de un 80% de agua frente a un 1% de ADN, es lógico pensar que la mayoría de los efectos de la irradiación *in vivo* son efectos indirectos. Cuando el oxígeno está presente en el medio, como ocurre en un tejido vivo, todo efecto indirecto se amplifica fruto de la producción de los radicales libres que se forman en los procesos como la radiolisis.

Hay evidencias que indican que las macromoléculas son más radiosensibles cuando se irradian las células *in vivo* (dentro de un organismo) que cuando se realiza *in vitro* (fuera de la célula o del organismo). Dentro de los daños más frecuentes en las macromoléculas, destacan las uniones cruzadas, las escisiones de cadena principal y las lesiones puntuales. Estas modificaciones alteran las propiedades estructurales y fisicoquímicas de las macromoléculas irradiadas pudiendo resultar tanto en escisiones de la cadena principal como en pequeñas modificaciones en la molécula que alteran la funcionalidad de la misma como de la célula (Morcillo M.A., 2018).

Entre los efectos que producen las radiaciones en las macromoléculas, las consecuencias de la acción directa o indirecta de las radiaciones sobre las moléculas de ADN de la célula son las que mayor trascendencia biológica presentan. Esto se debe a que es en las moléculas de ADN donde se codifica toda la información requerida para el correcto funcionamiento de las células y para su transmisión a la descendencia. El ADN por tanto es una molécula importante con gran sensibilidad a la radiación, un concepto base que se explica en la Teoría del Blanco. Dicha teoría afirma que, dentro de la gran cantidad y variedad de macromoléculas que contienen las células, algunas se encuentran en superabundancia mientras que otras son escasas, de manera que para que una célula muera tras ser irradiada debe haberse

producido la inactivación de su molécula blanco, una molécula que es fundamental para su funcionamiento y cuya función no puede ser sustituida por otra. Una molécula blanco importante es el ADN.

Las lesiones resultantes de la radiación en la molécula de ADN son variadas y engloban diversas alteraciones, como la pérdida o sustitución de bases nitrogenadas, la ruptura de puentes de hidrógeno entre bases nitrogenadas, roturas simples o dobles de las hebras de ADN, etc. Las radiolesiones que afectan a los puentes de hidrógeno, bases nitrogenadas y roturas simples suelen ser reparadas por mecanismos intracelulares, sin embargo, las roturas de doble hebra suelen tener mayores efectos biológicos, produciendo cambios estructurales en la molécula de ADN que pueden llevar a aberraciones en los cromosomas (Morcillo M.A., 2018). Estas aberraciones cromosómicas pueden utilizarse como indicador cualitativo de la dosis de radiación absorbida. El daño en el ADN puede producir una actividad metabólica anormal que desencadene una rápida proliferación celular. Si el daño se produce en una célula germinal, es posible que los efectos no se observen hasta las siguientes generaciones. En general, los tres principales efectos observables resultado de la irradiación de ADN son la muerte de la célula, el daño genómico y en algunos casos, aumento de la proliferación. Los dos últimos efectos se ajustan a una relación lineal dosis-respuesta sin umbral (Carlyle B. S., 2010).

Cuando la lesión no induce la activación de los sistemas de reparación, la célula es incapaz de replicar el ADN dañado y entra en muerte proliferativa. La activación de los mecanismos de reparación depende de la lesión producida. Si el mecanismo actúa en fase pre-replicativa, es probable que la lesión se restaure y que el genoma de la célula permanezca igual que antes de la irradiación. Respecto a los mecanismos post-replicativos, hay mayor probabilidad de que tras su actuación aparezcan cambios en la secuencia del ADN dañado debido a que el mantenimiento estructural del ADN se realiza a expensas de modificaciones en la secuencia de las zonas dañadas por la radiación (Morcillo M.A., 2018). Estas mutaciones cambian, en la mayoría de los casos, la información genética de la célula y de su descendencia. Algunas de las mutaciones resultantes inhabilitan a la célula para replicar su genoma de manera que tienen efectos letales mientras que otras mutaciones, pese a ser compatibles con la vida, activan algún gen promotor de tumores o inactiva a un gen de represión tumoral. Otra posibilidad es que la mutación no conlleve ningún tipo de efecto somático en la célula, pero que genere inestabilidad genómica que a medio y largo plazo, después de varios ciclos celulares, resulte en la incapacitación proliferativa de la descendencia de la célula o bien, que se promueva un desarrollo neoplásico (Carlyle B. S., 2010).

En resumen, la radiación promueve la aparición de lesiones de distinto grado de severidad en el ADN celular. El resultado puede ser la delección de grandes segmentos de ADN (resultando en la muerte de la célula), en la reparación parcial del daño o en la reparación total del mismo. La reparación parcial de

la hebra de ADN puede derivar en mutaciones transmisibles o no transmisibles a la descendencia en función del tipo celular afectado (Yang S. *et al.*, 2015).

3.-RADIOTERAPIA Y PROTONTERAPIA COMO TRATAMIENTO ONCOLÓGICO

La radioterapia es uno de los tratamientos oncológicos más efectivos junto a la quimioterapia y la cirugía (Guerrero R. *et al.*, 2008). El uso clínico de las radiaciones ionizantes ha ido aumentando a lo largo de los últimos años debido al envejecimiento de la población, y al aumento de los diagnósticos y tratamientos para el cáncer (Michael J. *et al.*, 1993). Hoy en día, cerca del 50% de los pacientes con cáncer son tratados con radioterapia. El efecto terapéutico de las radiaciones ionizantes está basado en la capacidad que presentan para inducir la muerte de células tumorales. Sin embargo, la irradiación de tumores conlleva efectos adversos en el paciente derivados de la manifestación de muerte celular en tejido sano adyacente a la neoplasia casi de manera inevitable (Jones B. *et al.* 2018).

La radioterapia convencional con fotones y electrones se ha aplicado durante décadas. El método más empleado consiste en irradiaciones externas con fotones emitidos por un acelerador lineal (LINAC) sustentado por una estructura mecánica que rota alrededor del paciente. El acelerador descarga los fotones que se depositan, de manera indirecta, a través de electrones secundarios generados por las reacciones de ionización en la región irradiada. Cada haz de fotones penetra completamente en el paciente, lo cual puede emplearse para dirigir el tratamiento por imagen. La dosis de fotones representada en función de la profundidad de penetración muestra un máximo de deposición de energía en la región más superficial mientras que posteriormente la dosis decrece exponencialmente en las regiones más profundas del tejido irradiado (Figura 2). La excepción a esta situación serían los tumores pequeños más superficiales, para el resto de los tumores, se requiere una irradiación con múltiples haces de fotones desde distintos ángulos para asegurar la llegada de la mayor dosis posible al tumor, proceso que produce más daños en el tejido sano colindante.

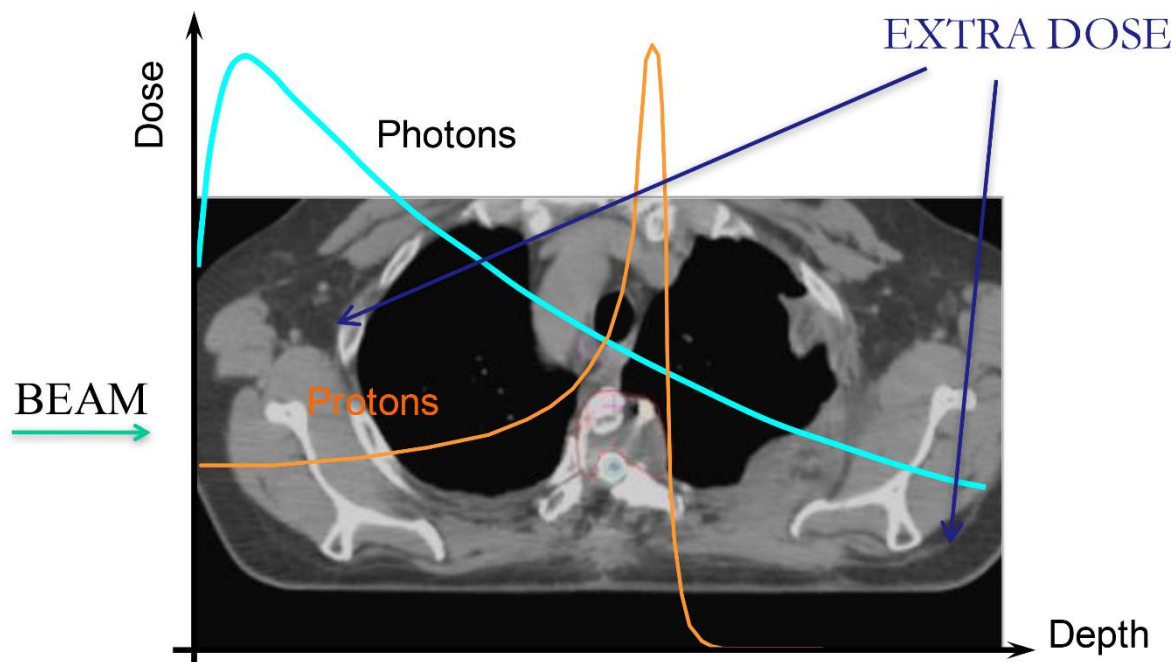


Figura 2. Distribución de dosis en función de la profundidad del tejido. Proveniente de un haz de fotones (azul) y de un haz de protones (naranja). La distribución de la dosis de fotones presenta un máximo cerca de la entrada con un descenso exponencial a medida que penetra en mayor profundidad. La distribución de protones aumenta con la profundidad, dando lugar a un Pico de Bragg en la región tumoral. En caso de tumores superficiales, la terapia con fotones presenta mayor ventaja (Paganetti H. *et al.*, 2015).

La radioterapia convencional, como se ha mencionado anteriormente, conlleva efectos secundarios derivados del daño a tejido sano circundante al tumor. Un ejemplo son los efectos secundarios descritos en radioterapia para cáncer de mama, como lesiones en las arterias coronarias y arterosclerosis fruto de la inestabilidad genómica producida. Además, hay estudios que indican un mayor riesgo de padecer isquemia cardíaca en mujeres con cáncer de mama tras tratamientos de radioterapia superiores a 5 Gy, con incrementos de un 7% de padecerla a medida que se aumenta 1 Gy a partir de dicho umbral (Sarah C. *et al.*, 2013). La distinción entre tejido tumoral y tejido sano en ocasiones es complicada, en concreto en tumores que se infiltran en tejido sano como es el caso del glioblastoma multiforme humano, un tipo de cáncer cerebral (Blanchard P. *et al.*, 2017). Aunque el tejido tumoral se distingue claramente del sano, el tejido circundante también es afectado por la irradiación durante el tratamiento debido a que a veces es necesario atravesarlo para alcanzar el tumor. En ocasiones la irradiación de tejido sano colindante al tumor se hace de manera deliberada con el objetivo de evitar la posible expansión de células tumorales hacia dicha región, proceso difícil de detectar por diagnóstico por imagen (Iwadate Y. *et al.*, 2001). La prioridad principal es suministrar la dosis correcta al tumor de manera homogénea pese a que los tumores son altamente heterogéneos y responden a la radiación de manera diferente a lo largo de su estructura. La dosis suministrada varía en función de si el paciente recibe otros tratamientos como la quimioterapia y de la dosis máxima tolerada por los tejidos colindantes al tumor, un factor que se estima

de manera empírica en función de la localización del tumor y de los posibles órganos afectados (Paganetti H. *et al.*, 2015).

La muerte celular derivada de la irradiación, tanto del tejido tumoral como del tejido sano colindante, no suele ocurrir de manera instantánea, sino que es el resultado de un proceso gradual que se desencadena principalmente con los daños bioquímicos producidos en el ADN, los cuales incapacitan en la mayoría de los casos a la célula para realizar sus funciones vitales. En algunas ocasiones poco frecuentes, esta muerte celular derivada de la irradiación puede ser instantánea, ocurriendo antes de que la célula se divida. Es lo que conocemos como muerte en interfase, y puede observarse en líneas celulares altamente proliferativas como los linfocitos. Los tumores desarrollados a partir de este tipo de estirpes celulares altamente proliferativas normalmente muestran mayor índice de radiosensibilidad, con buena respuesta a radioterapia (Paganetti H. *et al.*, 2015).

La predicción de la respuesta biológica de un tumor después de la irradiación sigue siendo un reto hoy en día. Desde el descubrimiento de la radioterapia, se sabe que el efecto biológico de la radiación no solo viene determinado por la dosis total, sino que también lo determinan características del tratamiento como la dosis fraccionada, la tasa de dosis y la duración total (Leeuwen C. *et al.*, 2018). Muchos modelos se han propuesto para predecir la respuesta biológica a la irradiación. El modelo cuadrático-lineal (LQ) es el que mejor explica el comportamiento radiobiológico y el que mayor aplicación clínica presenta en oncología, ya que permite describir la respuesta celular tras la interacción con radiaciones ionizantes de entre 5 y 6 Gray (Gy), dosis ampliamente usadas en clínica (Michael J. *et al.*, 1993). El modelo LQ describe la fracción de supervivencia (SF) de células clonogénicas en función de la dosis de radiación recibida (D) (Figura 3)

$$SF(D) = e^{(-\alpha D - \beta D^2)}$$

Los parámetros más importantes de este modelo son α (Gy^{-1}) y β (Gy^{-2}). Estos valores representan la radiosensibilidad intrínseca de las células irradiadas. El valor resultado de la división de ambos parámetros α/β (Gy) es una medida de la sensibilidad fraccionada que muestran las células (Figura 3). Aquellas células que presenten un índice α/β elevado son menos sensibles al efecto atenuado de la dosis suministrada en un tratamiento de radioterapia fraccionado, es decir, serán más resistentes a la radiación y necesitarán dosis más altas para conseguir la muerte celular por acumulación de daños subletales. En este sentido, el modelo LQ tiene utilidad clínica para predecir el efecto que supondrá el fraccionamiento de la radioterapia, además de para comparar el equivalente de la dosis total suministrada entre las distintas combinaciones de dosis fraccionada posibles. El diseño del tratamiento de radioterapia para uso clínico depende de una estimación correcta de los parámetros α y β . Dichos parámetros pueden medirse *in vitro* mediante estudios con cultivos de líneas celulares tumorales (Donald J. *et al.*, 2015)

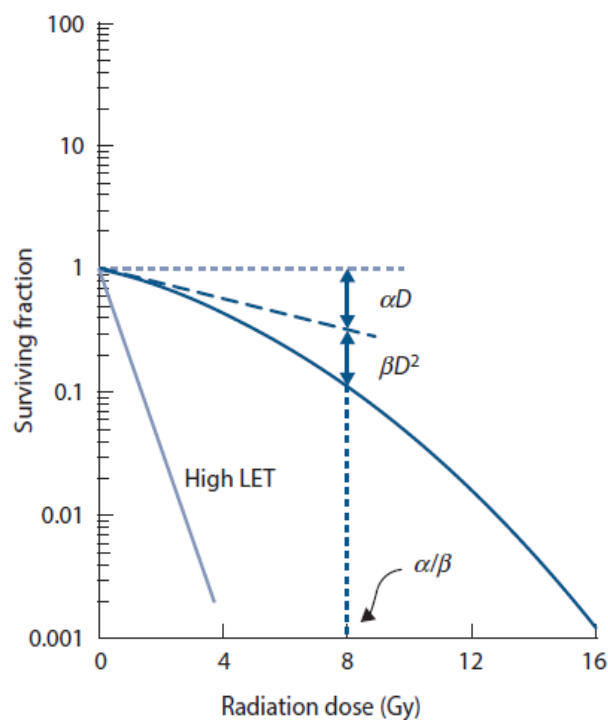


Figura 3. Modelo LQ en escala logarítmica. Muestra curva de supervivencia determinada por el valor α/β . El valor del cociente α/β se corresponde con aquella dosis a la cual la contribución lineal al daño (αD) es igual a la contribución cuadrática (βD^2) (Michael J. et al., 1993).

Debido a los efectos secundarios que produce la radioterapia convencional, se han desarrollado alternativas como la protonterapia. El uso clínico de protones se ve favorecido por la alta dosis depositada en el tejido diana en relación con la radioterapia convencional (Bravatà V. *et al.*, 2019). Los protones se desplazan a lo largo del tejido ralentizándose y perdiendo energía principalmente por el elevado número de interacciones de Coulomb con los electrones atómicos e interacciones nucleares que encuentran a su paso. Durante esta ralentización, se produce la deposición de energía a lo largo de la trayectoria que sigue el electrón. La pérdida de energía por unidad desplazada (LET) depende de la velocidad del protón e incrementa con la profundidad de penetración en la diana, es decir, cuanto más penetra el protón, más energía deposita en el tejido. Este factor representa la media de energía liberada por micrómetro de distancia recorrido por la partícula radiactiva, y es representada en unidades de KeV por micrón (Jones B. *et al.*, 2018). Los protones, presentan una LET que incrementa lentamente durante una larga distancia de penetración hasta que sufre un incremento rápido hacia el final su trayectoria. El resultado de este fenómeno es una deposición relativamente baja en el tejido más superficial mientras que el máximo de deposición de energía, denominado Pico de Bragg, está delimitado en una región estrecha cerca del final del trayecto del protón. De esta manera, controlando la energía aplicada inicialmente, es posible dirigir el Pico de Bragg a la región afectada por el tumor, reduciendo considerablemente el daño en el tejido sano colindante (Figura 2) (Paganetti H. *et al.*, 2015).

El parámetro RBE (Relative Biological Effectiveness) permite comparar la dosis que necesitan distintos tipos de radiaciones para producir el mismo efecto biológico (Michaelidesová A. *et al.*, 2017). En la

práctica clínica, actualmente se recomienda para la protonterapia el uso de una RBE de 1.1 para todos los tejidos independientemente de la dosis y la LET, según la Comisión Nacional de Unidades y Medidas Radiológicas (ICRU). Este parámetro se calcula con la siguiente fórmula (Schmitz T. *et al.*, 1997):

$$\text{RBE} = \frac{\text{Dosis estándar de radiación}}{\text{Dosis de radiación evaluada para un efecto dado}}$$

En general, la RBE en haces de protones es mayor a medida que aumenta la LET. Un incremento en LET, un comportamiento típico en la trayectoria que siguen los protones cuando son irradiados en un tejido biológico, no ocurre en la radioterapia convencional con fotones (Figura 2). De esta forma, la irradiación con protones es biológicamente más efectiva que los fotones de alta energía. Los parámetros RBE y LET están correlacionados ya que la RBE inicialmente incrementa de manera lineal con el parámetro LET (Schmitz T. *et al.*, 1997). A valores LET más altos, el parámetro RBE ralentiza su incremento hasta que disminuye por la pérdida de energía. El incremento de RBE está relacionado inversamente con la dosis y de manera no lineal, con los parámetros de radiosensibilidad celular intrínsecos α y β . La RBE tiende a aumentar a medida que disminuye el parámetro α/β del modelo LQ. En la práctica, ambos parámetros, tanto RBE como LET, permiten personalizar el tratamiento de radioterapia suministrado al paciente en función del tipo de tumor y de las características que presente (Kammerer E. *et al.*, 2018).

La precisión a la hora de determinar la distribución de la dosis en el paciente irradiado, con el objetivo de centrarla en el tumor, es un paso clave en la hora de proporcionar un tratamiento oncológico adecuado. Hasta ahora, existen incertidumbres a la hora de determinar la posición distal del haz de protones y en el cálculo de la dosis suministrada. Para poder maximizar el aprovechamiento del potencial terapéutico de la protonterapia, se requiere una determinación precisa del rango que alcanzan los protones en el tejido irradiado (Mohan R. *et al.*, 2017)

Actualmente, el número de instituciones capacitadas para proporcionar un tratamiento por protonterapia ha incrementado en los últimos 10-15 años hasta cerca de los 70 centros operativos a nivel mundial. Actualmente están en construcción los dos primeros centros en España especializados en este tipo de terapia (Morcillo, M.A., 2018). Hay tres desventajas que deben superarse para optimizar la seguridad y efectividad de su utilización. (1) La localización del pico de Bragg puede ser, en ocasiones, imprecisa debido a factores como la heterogeneidad en la densidad de los tejidos irradiados o al sistema de producción de protones empleado. (2) Otro factor importante es que, en el pico de Bragg, la energía depositada está muy localizada, de manera que el daño en el ADN que se produce es más difícil de reparar por los mecanismos enzimáticos, dando lugar a un incremento en los efectos biológicos. Esto puede ser beneficioso si se produce en tejido neoplásico, pero perjudicial si afecta a tejido sano colindante. (3) Hoy en día la prescripción médica de la protonterapia incluye una reducción de dosis

del 10% en todos los tejidos tratados para compensar el efecto biológico incrementado. Este factor de corrección puede ser difícil de estimar si se desconocen los factores físicos y biológicos por los que se produce el efecto biológico incrementado y las características que influyen en su variación.

Como se ha mencionado anteriormente, la muerte celular provocada por el tratamiento con radiaciones es el resultado final de varios factores, tanto físico como biológicos. Entre ellos se encuentran la dosis total absorbida, el tipo de radiación, la dosis, el fraccionamiento de la dosis, la distribución, el tipo celular y el microambiente en el que se encuentren (incluyendo la oxigenación). Debido a la complejidad de las células tumorales y de la naturaleza heterogénea del tejido neoplásico, la muerte de cada una de las células que lo componen ocurre en momentos distintos tras el tratamiento. Es habitual encontrarse con células que resisten al tratamiento, otras células que mueren tras dividirse unas pocas generaciones y otras células que mueren antes de poder dividirse. Aunque actualmente no se puede predecir la cifra exacta de divisiones que lleva a cabo una célula antes de morir por los daños causados por la radiación, se estima que normalmente mueren tras haber completado seis ciclos celulares (Michael J. et al., 1993). Como cuantificar la muerte celular desde un enfoque individual es una tarea muy complicada, se propone la alternativa de la muerte clonogénica, haciendo alusión a la supervivencia clonogénica, que es el mantenimiento celular de la capacidad proliferativa indefinida. La muerte clonogénica es por tanto la pérdida, por parte de la célula, de la capacidad de proliferar indefinidamente. Para estudiar los efectos biológicos de los distintos tipos de radiaciones se pueden utilizar técnicas como los estudios de clonogenicidad y ensayos de supervivencia celular, entre otros.

4.- ENSAYOS DE CLONOGENICIDAD

El mantenimiento de un tejido biológico y de su función, depende de la replicación de un pequeño número de células con capacidad de proliferar y formar otras células que se diferencian en las células que conforman el tejido en cuestión. Este proceso es fundamental en el mantenimiento del tejido neoplásico en cáncer. Cuando un tumor recidiva después de haber sido tratado, es debido a que algunas de las células neoplásicas que lo conforman no fueron eliminadas y sobrevivieron al tratamiento (Buch, K. *et al.*, 2012). Los ensayos de clonogenicidad se han desarrollado como una técnica capaz de detectar la presencia de células cancerígenas capaces de resistir el tratamiento proporcionado y de promover la recaída del paciente.

Un ensayo de clonogenicidad es una técnica basada en cultivos celulares que permite evaluar la capacidad de células tumorales para proliferar y formar colonias tras ser tratadas con un agente citotóxico, como un fármaco o la radiación. Este tipo de ensayos se realizan a partir de un clon proveniente de una línea celular cultivada en laboratorio obtenida a partir de una biopsia tumoral. Para comenzar con un estudio de clonogenicidad, se requiere un número de células suficiente, crecidas en monocapa y adheridas a la superficie de la placa empleada (Rafehi H. *et al.*, 2011). Cuando se alcanza el número de células requerido por el diseño del experimento, se procede a la disgregación del cultivo

mediante métodos químicos o físicos y las células individualizadas se siembran en una concentración conocida para ser tratadas con un agente potencialmente capaz de paralizar su proliferación (ej. Radiación). El control negativo en este tipo de experimentos no se trata con el agente citotóxico, de manera que es posible sustraer el efecto las variables que pueden influir en la proliferación y que no se controlan de manera explícita a la hora de diseñar el experimento (Figura 4). El conocimiento de estas variables se requiere para estimar la eficacia de siembra. Hay dos formas principales de afrontar un ensayo de clonogenicidad basadas en el momento de aplicar el tratamiento, el cual puede aplicarse antes de ser sembradas o bien después de ser sembradas (Franken N. A. P. *et al.*, 2006).

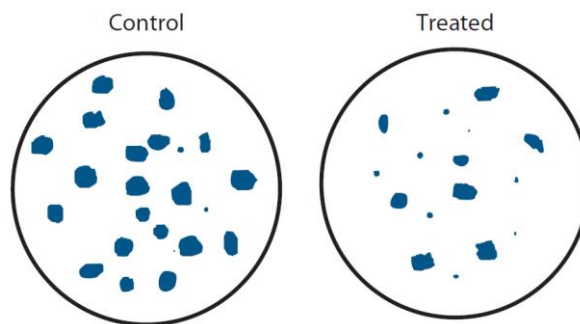


Figura 4. Fundamento de un ensayo de clonogenicidad. Se requiere un control sin irradiar para comparar el efecto de la radiación en las placas tratadas. A medida que incrementa la dosis irradiada, disminuye el número de colonias y aumenta la proporción de colonias de menor tamaño (Michael J. *et al.*, 1993)

Toda célula en ausencia o presencia de los nutrientes necesarios termina envejeciendo y muriendo tras completar varios ciclos celulares. Es necesario establecer un límite de divisiones celulares para poder contar con un criterio que permita evaluar si una célula mantiene su capacidad de división tras recibir un tratamiento. Bajo este criterio, diremos que si una célula tras ser irradiada puede formar colonias de un mínimo de 50 células ($2^6 = 64$, siendo el exponente 6 el número de ciclos celulares que suelen completar una célula irradiada antes de morir) habrá formado un clon que sigue presentando capacidad clonogénica pese al tratamiento. Algunas células, después de ser tratadas, pueden formar “minicolonias” ya que, pese a estar dañadas, conservan capacidad clonogénica limitada que acaban perdiendo trascurridas unas pocas generaciones, de manera que no pueden ser consideradas como supervivientes al tratamiento (Michael J. *et al.*, 1993).

A la hora de realizar estudios de clonogenicidad con distintas líneas celulares, hay que tener en cuenta dos parámetros que consideran diferencias en la capacidad de proliferar y de resistir al tratamiento entre distintos tipos de células cancerígenas. Estos parámetros son la eficiencia de plaqueo (PE), que nos permite conocer la cantidad de colonias formadas en función de las células que fueron sembradas, y la fracción de supervivencia (SF), que permite conocer el número de colonias desarrolladas tras aplicar el tratamiento en estudio (Franken N. A. P. *et al.*, 2006).

$$PE = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colonias formadas}}{\text{n}^\circ \text{ de células sembradas}} \times 100$$

$$SF = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colonias formadas sin tratamiento}}{\text{n}^\circ \text{ de células sembradas} \times PE}$$

La supervivencia celular en este tipo de ensayos está determinada por el parámetro PE. A la hora de determinar dicho parámetro, se asume que es independiente del número de células sembradas inicialmente, dentro de un rango de “número de células cultivadas” posible. Por motivos estadísticos, las células se siembran normalmente para obtener un número constante de colonias en cada placa y tratamiento, entre 25 y 200 colonias (Pomp J. *et al.*, 1996). Para conseguirlo, se debe incrementar el número de células sembradas a medida que incrementa la dosis de tratamiento, siempre y cuando la formación de colonias sea independiente de la densidad celular sembrada. La necesidad de incrementar el número celular sembrado a medida que aumenta la dosis de tratamiento se explica con dos modelos de supervivencia celular, producidos por la exposición a la radiación: (a) el modelo de blanco único, impacto único y (b) el modelo de blanco múltiple, impacto único. Ambos modelos coinciden en que, en el caso de la irradiación de un número grande de células, muere un mayor número de ellas que si la misma dosis de radiación se aplica a una placa con menos cantidad de células, debido a que parte de los impactos se producirán en lugares donde no hay células sembradas (Pomp J. *et al.*, 1996). A dosis de radiación bajas, la supervivencia de las células es cercana al 100%. A medida que aumenta la dosis de radiación aplicada, sobreviven menos células debido a la mayor cantidad de impactos y daños en moléculas blanco. Cuando las dosis de radiación son elevadas, las células supervivientes presentan al menos, un impacto en un blanco; por consiguiente, a dosis aún más elevadas, la relación dosis-respuesta responderá al modelo de blanco único, impacto único (a). Hay estudios con células supervivientes a la irradiación inicial, que vuelven a ser cultivadas e irradiadas de nuevo, que indican una recuperación de las características que presentan las células no irradiadas, es decir, muestran una recuperación del daño subletal producido por la irradiación inicial. (Carlyle B. S., 2010).

Tradicionalmente, el estudio de la supervivencia celular a radiaciones se realiza a través de ensayos de clonogenicidad, pero hay situaciones en la que este tipo de ensayos no proporcionan resultados satisfactorios. Los estudios de supervivencia a irradiación con células no formadoras de colonias no pueden realizarse mediante ensayos de clonogenicidad, por lo que los ensayos de actividad metabólica por reducción de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) son el método elegido para este tipo de casos (Angius F. *et al.*, 2015).

5.- ENSAYOS MTT

Los ensayos de actividad metabólica celular por reducción de MTT, permiten cuantificar la viabilidad metabólica de la célula a través de su capacidad para reducir las sales de tetrazolio de color amarillo a un compuesto azulado por acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (Price P., *et al.* 1990). El compuesto resultante puede disolverse y ser cuantificado midiendo la absorbancia de la solución resultante, que está directamente relacionada con la cantidad de células vivas presentes en el pocillo. Este tipo de ensayos pueden emplearse para evaluar el impacto de las radiaciones ionizantes sobre la supervivencia y la proliferación celular. Las ventajas principales de este tipo de ensayos

respecto a los ensayos de clonogenicidad, es la semiautomatización del sistema de lectura por absorbancia, el bajo coste, la alta reproducibilidad, el bajo número de células requerido y la facilidad para cuantificar células no formadoras de colonias que crecen en suspensión, en monocapa o en esferoides, además de dar buenos resultados en líneas celulares formadoras de colonias.

Los dos principales problemas de estos ensayos son: (a) que la absorbancia producida por la presencia de células puede estar influenciada por la concentración de MTT utilizada inicialmente y por el tiempo de incubación; (b) que la relación entre el número de células y la absorbancia en un rango amplio de números de células no es lineal, de manera que la SF no puede calcularse comparando los valores de absorbancia, excepto en ensayos con poca cantidad de células que caigan en la parte lineal de la curva de calibrado (Van Tonder A. *et al.*, 2015). Los resultados que se obtienen de este tipo de ensayos dependen de las condiciones en las que se realicen, de la relación entre la absorbancia y el número celular, y de la manera de interpretar los resultados. Para poder estudiar *in vitro* la radiosensibilidad de células tumorales empleando ensayos de MTT, se requiere individualizar primero la relación entre la absorbancia y el número de células de cada tumor con el objetivo de tener una base comparativa (Stepanenko A. *et al.*, 2017).

6.- OBJETIVOS

El presente trabajo pretende estudiar algunos de los efectos biológicos producidos tras la irradiación de dos líneas celulares con rayos X. Para ello, se realizarán estudios *in vitro* mediante cultivos celulares en 2D de dos tipos de líneas distintas, la A-549 y la U-251.

Los experimentos realizados tienen como objetivos principales:

1. Evaluar cómo varía la supervivencia celular a distintas dosis de radiación mediante ensayos de clonogenicidad que permiten determinar las fracciones de supervivencia, los cambios en el tamaño de las colonias y las curvas del modelo lineal cuadrático para extraer los parámetros α y β .
2. Comprobar que el ensayo MTT es un procedimiento adecuado para cuantificar la viabilidad celular tras aplicar distintas dosis de radiación a los cultivos celulares
3. Establecer de una base experimental comparativa para poder replicar, en el futuro, dichos estudios irradiando con protones y así determinar el parámetro RBE.

En estos estudios, los resultados obtenidos servirán para establecer una referencia frente a ensayos posteriores con protones que facilitará la elección de un tratamiento radiológico adecuado a cada tipo tumoral, tras el establecimiento de una relación directa entre la protonterapia y la radioterapia convencional mediante el cálculo del parámetro RBE.

CAPÍTULO 2: MATERIAL Y MÉTODOS

1.- CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

Para el estudio se emplean dos líneas celulares, la A-549 (carcinoma epitelial de pulmón humano) y la línea celular U-251 (glioblastoma multiforme humano). Estas células fueron cedidas respectivamente por Montserrat Sánchez-Céspedes (Unidad de Genética y Cáncer, Programa de Epigenética y Biología del Cáncer, Bellvitge Biomedical Research Institute) y por Alberto Schumacher (Grupo de Tumores Cerebrales, Programa de Oncología Molecular, CNIO). Ambas líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma) 1X + GlutaMAX (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco), 1% de antibióticos penicilina y streptomina (10.000 U penicilina + 10mg/ml streptomina; SIGMA) a 37°C con 5% de CO₂ al 95% de humedad. Las células se cultivaron en placas P100 hasta alcanzar el 80% de confluencia, según las recomendaciones de la American Type Culture Collection (ATCC) para cada línea celular, correspondiente a la fase exponencial de crecimiento. (Buch K. *et al.*, 2012).

2.- ESTUDIOS FUNCIONALES

Los ensayos de clonogenicidad y MTT se realizaron conjuntamente en ambas líneas celulares (células A-549 y U-251) partiendo de una placa P100 de cada línea celular al 80% de confluencia. Todos los procedimientos se realizaron en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Ambas líneas celulares se levantaron incubando con tripsina Tryple™ Express (Gibco) a 37°C hasta cubrir toda la superficie, con previos lavados con PBS 37°C (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Sigma) para eliminar restos de medio de cultivo.

Una vez despegadas las células, se empleó medio de cultivo DMEM (1X) + GlutaMAX (Gibco) suplementado con 10% FBS (Gibco) y 1% de antibióticos penicilina y streptomina (10.000 U penicilina + 10mg/ml streptomina; SIGMA) para mantenerlas en suspensión. Se realizó el conteo de células de cada línea celular en cámara de Neubauer bajo microscopio óptico y se preparó una dilución en tubo Falcom a 10.000 células/ml para cada línea celular con medio completo, con el objetivo de obtener una proporción celular suficiente para proceder con los ensayos siguientes:

2.1.- ENSAYOS DE SUPERVIVENCIA CELULAR

A partir de la suspensión celular de 10.000 células/ml para cada línea celular, se realizó la siembra de cada tipo en cuatro placas de seis pocillos (P6). Las cantidades sembradas para cada línea celular fueron calculadas basándose en estudios previos y en literatura relacionada, de manera que al final del ensayo se obtuviese un número de colonias adecuado para el conteo. En el caso de la línea celular A-549, se sembraron cuatro placas P6 con tres réplicas técnicas para cada concentración. Las cantidades celulares sembradas fueron:

1. En el control negativo (no irradiadas), 200 células/pocillo y 400 células/pocillo.
2. Para posterior irradiación a 1 Gray (Gy), 200 células/pocillo y 400 células/pocillo.
3. Para posterior irradiación a 2 Gy, 400 células/pocillo y 600 células/pocillo.
4. Para posterior irradiación a 5 Gy, 1.500 células/pocillo y 2.000 células/pocillo.

En el caso de la línea celular U-251, se sembraron cuatro placas P6 con tres réplicas técnicas para cada cantidad celular. Las cantidades de células sembradas fueron:

1. En el control negativo (no irradiadas), 200 células/pocillo y 400 células/pocillo.
2. Para posterior irradiación a 1 Gy, 400 células/pocillo y 600 células/pocillo
3. Para posterior irradiación a 2 Gy, 400 células/pocillo y 600 células/pocillo
4. Para posterior irradiación a 5 Gy, 600 células/pocillo y 900 células/pocillo.

La irradiación de las placas de ambas líneas se realizó un día después de la siembra, en el irradiador de rayos X Philips MG324 con tubo MCN 321 de las instalaciones del CIEMAT, a 300 kV, 10 mA y 95 rad/min. Las placas P6 irradiadas con 1 Gy estuvieron expuestas a la radiación 1 min 03 segundos. Las correspondientes a 2 Gy fueron irradiadas durante 2 minutos 06 segundos. Las placas de 5 Gy fueron irradiadas durante 5 minutos y 15 segundos.

Tras la irradiación, se incubaron las placas de ambas líneas celulares a 37°, 5 % CO₂ y 95% de humedad. Tras 5 días de incubación, se le añadió 1 ml de DMEM (1X) + GlutaMAX (Gibco) suplementado con 10% FBS (Gibco) y 1% de antibióticos penicilina y streptomicina (10.000 U penicilia + 10mg/ml streptomicina; SIGMA) a cada pocillo en ambas líneas celulares.

La fijación y la tinción de las placas se realizó 9 días después de la irradiación en el caso de la línea celular U-251 y 11 días después de la irradiación para el caso de la línea A-549. En ambos casos, se eliminó el medio de los pocillos en todas las placas y se lavaron las células con agua. Posteriormente se fijaron y se tiñeron las colonias con una solución de cristal violeta (0.05% de cristal violeta, 1% formaldehído, 1X de PBS y 1% de metanol).

El conteo de las colonias se realizó con el software de análisis de imagen ImageJ (Schneider, C.A. *et al.*, 2012) y se empleó el software SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) para determinar la PE y la SF mediante las fórmulas:

$$PE = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colonias formadas}}{\text{n}^\circ \text{ de células sembradas}} \times 100 \qquad SF = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colonias formadas sin tratamiento}}{\text{n}^\circ \text{ de células sembradas} \times PE}$$

Los parámetros α y β se calcularon por SPSS empleando la fórmula no lineal:

$$SF(D) = e^{(-\alpha D - \beta D^2)}$$

Se muestra un esquema del procedimiento en el Apéndice 1, 1.1

2.2.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD METABÓLICA CELULAR POR MTT

A partir de la misma suspensión de 10.000 células/ml para cada línea celular, se realizó la siembra de cada tipo celular en doce placas de 96 pocillos (P96). Cada cuatro placas corresponden a una condición, tres de ellas fueron irradiadas con diferentes dosis mientras que una de ellas corresponde al control negativo sin irradiar. Cada condición se replicó en tres placas (Día 1, Día 2 y Día 3). En cada placa se sembraron dos cantidades distintas para cada línea celular, 2.000 células/pocillo y 4.000 células/pocillo (con tres réplicas técnicas para cada cantidad celular sembrada). Se empleó un pocillo por cada fila para el conteo celular y dos pocillos en cada placa como blanco (sin células). Se eligieron estas cantidades en base a literatura relacionada con el objetivo de asegurar que las células se encontrasen en fase de crecimiento exponencial durante los días del experimento. Tres de las cuatro placas para cada día (Día 1, Día 2 y Día 3) se irradiaron a 1 Gy, 2 Gy y 5 Gy en el irradiador de rayos X Philips MG324 con tubo MCN 321 de las instalaciones del CIEMAT, a 300 kV, 10 mA y 95 rad/min.

Tras la irradiación, se incubaron las placas de ambas líneas celulares a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad durante 24 horas. Después de la incubación se comenzó con el ensayo empleando el kit de proliferación celular “Cell Proliferation Kit I (MTT)” de Roche:

- Día 1: se añadió el reactivo de unión correspondiente basado en la sal de tetrazolio MTT 1X a todos los pocillos excepto a los reservados para el conteo celular y se incubaron las placas en incubador a 37°, 5% CO₂ y 95% de humedad durante 4 horas. Tras el periodo de incubación, se añadió el reactivo de solubilización (10% SDS en 0.01 M HCl) 1X y se incubó durante toda la noche en las mismas condiciones descritas previamente.
- Día 2: El conteo de las células se hizo en cámara de Neubauer a partir de los pocillos de la P96 reservados para día 2. Se realizó la medición de los pocillos correspondientes al Día 1 tras su incubación. Para ello se empleó el lector de placas FLUOstar® Omega (BMG Labtech) para medir la absorbancia a 570 nm y 690 nm. Se repitió el procedimiento descrito en el punto anterior aplicado a la placa correspondiente al Día 2.
- Día 3: Se realizó la medición de la placa correspondiente al Día 2 y se repitió el primer punto para la placa del Día 3.
- Día 4: se realizó la medición de la placa correspondiente al Día 3.

Se muestra un esquema del procedimiento en el Apéndice 1, 1.2

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Un test ANOVA se empleó para comparar las medias entre diferentes grupos. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos se analizaron mediante el test de comparaciones múltiples de Dunnett. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis se realizó mediante software SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 14.0).

Armonk, NY: IBM Corp.). Para la detección de “outliers” en la muestra, se utilizó el test de Grubbs mediante software GraphPad Prism (Versión 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com”).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

1.- ENSAYOS DE CLONOGENICIDAD

Los valores medios de SF obtenidos se recogen en la Tabla 1, donde se aprecia una reducción del 80.6% respecto al control negativo en ambas líneas celulares tras ser irradiadas a 5 Gy. Las representaciones gráficas se recogen en la Figura 5. Se aprecia una tendencia decreciente en el índice SF en ambas líneas celulares.

Tabla 1. Ensayo de clonogenicidad: Valores medios de la SF y su desviación estándar para cada dosis de radiación

Dosis	A-549		U-251	
	SF	SD	SF	SD
0	1	0,232	1	0,213
1	0,845	0,142	0,733	0,297
2	0,635	0,237	0,657	0,296
5	0,194	0,074	0,194	0,099

Nota: n = 6 para cada dosis

Los parámetros α y β calculados se recogen en la Tabla 2. La línea celular U-251 presenta un valor α/β superior al de la línea A-549.

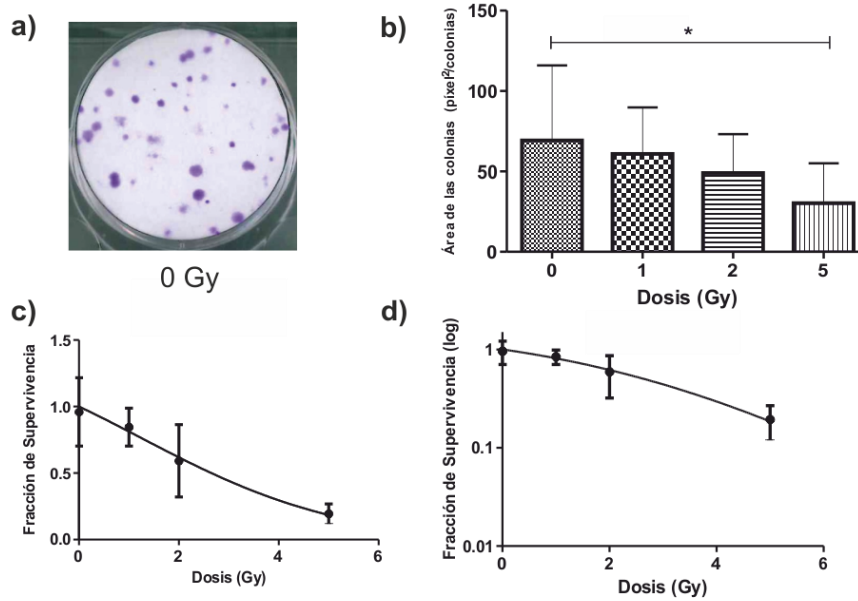
Tabla 2. Ensayo de Clonogenicidad: Parámetros α y β del modelo LQ

Línea celular	Parámetro	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
A549	α	0,175	0,067	0,040	0,311
	β	0,0323	0,022	-0,012	0,076
	α / β	5,427	5,565	-5,797	16,650
U251	α	0,211	0,083	0,044	0,379
	β	0,020	0,026	-0,032	0,0720
	α / β	10,59	17,48	-24,072	45,900

Nota: se han analizado 46 datos con 44 grados de libertad para A-549 y 43 datos con 41 grados de libertad para U-251

Los resultados obtenidos respecto a la variación en el tamaño de la superficie de las colonias formadas se representan en la Figura 5. Se observan diferencias significativas en la línea A-549 tras ser irradiada a 5 Gy respecto al control negativo sin irradiar.

A-549



U-251

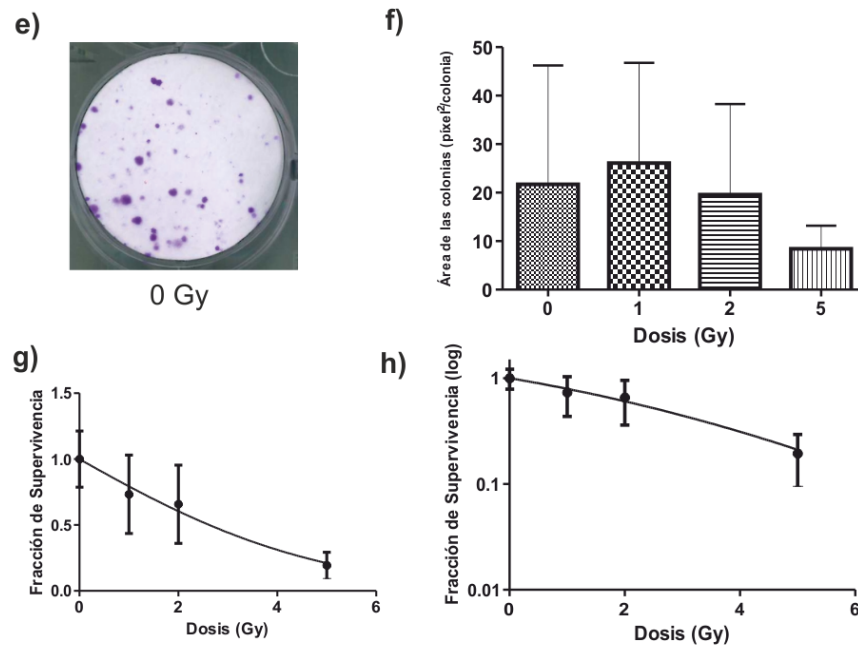


Figura 5. Ensayo de supervivencia celular. Todos los datos se muestran como la media \pm SD. (a y e) pocillo correspondiente al control negativo sin irradiar sobre el que se comparan los tratamientos. Para el conteo de colonias por software ImageJ se establece un umbral de manera que solo se analizan las colonias por encima de 112 píxel²/colonia en el caso de A-549 y 190 píxel²/colonia para el caso de U-251. (b y f) Distribución del área media de las colonias formadas en función de la dosis de radiación aplicada. El área disminuye con la dosis de forma estadísticamente significativa en la línea celular A-549 (*p < 0.05). En el caso de la línea U-251 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. (c y g) Variación de SF en función de las dosis aplicadas. (d y h) Variación de SF (en escala logarítmica) según la dosis.

Se realizó un test ANOVA para comparar las áreas de las colonias formadas. Los resultados se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Test ANOVA para el área media de las colonias

Línea celular	Fuente	Suma de cuadrados tipo III	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
A-549	Modelo corregido	10288,765 ^a	3	3429,588	3,268	0,030
	Intersección	131800,672	1	131800,672	125,591	125,591
	Dosis	10288,765	3	3429,588	3,268	3,268
	Error	46175,504	44	1049,443		
	Total	188264,941	48			
	Total corregida	56464,269	47			
U-251	Modelo corregido	1793,659 ^b	3	597,886	1,760	0,169
	Intersección	149953,892	1	1453,892	44,008	0,000
	Dosis	1793,659	3	597,886	1,760	0,169
	Error	14951,315	44	339,803		
	Total	31698,865	48			
	Total corregida	16744,973	47			

a. R cuadrado = 0,182 (R cuadrado corregida = 0,126)

b. R cuadrado = 0,107 (R cuadrado corregida = 0,046)

En el caso de U-251, el modelo corregido presenta un valor $P = 0.169$, que no cumple con la condición $P < 0.05$, de manera que no se puede rechazar la hipótesis de igualdad de medias.

En el caso de A-549, el modelo corregido presenta un valor $P = 0.03$, que cumple con la condición $P < 0.05$, por lo que se rechaza la hipótesis de igualdad de medias, es decir, el tamaño del área difiere según la dosis aplicada. Por tanto, se realizó un test de comparaciones múltiples de Dunnett para evaluar diferencias entre las medias de las áreas de las colonias formadas (Tabla 4).

Tabla 4. Test de comparaciones múltiples por Dunnett para el área de las colonias en A-549

Dosis (I)	Dosis (J)	Diferencia entre medias (I-J)	Error típico	Significación	Intervalo de confianza al 95%		
					Límite inferior	Límite superior	
A-549	1	0	-8,424	13,226	0,860	-40,598	23,750
	2	0	-20,339	13,225	0,298	-52,514	11,834
	5	0	-38,993*	13,225	0,014	-71,167	-6,818

Basado en las medias observadas. *. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

El tamaño de área va disminuyendo con la dosis en la línea A-549 existiendo diferencias significativas entre la dosis más alta y el control negativo. Aunque el tamaño de área en U-251 a 5 Gy es menor que en el control, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

2.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD METABÓLICA CELULAR POR MTT

En todos los casos (0 – 5 Gy) se observa un aumento general de la absorbancia a lo largo del tiempo, excepto la disminución que se produce a 2 días tras la irradiación a 1 Gy en la línea A-549 y el mantenimiento del valor de absorbancia que se aprecia en U-251 para el mismo día (Figura 6).

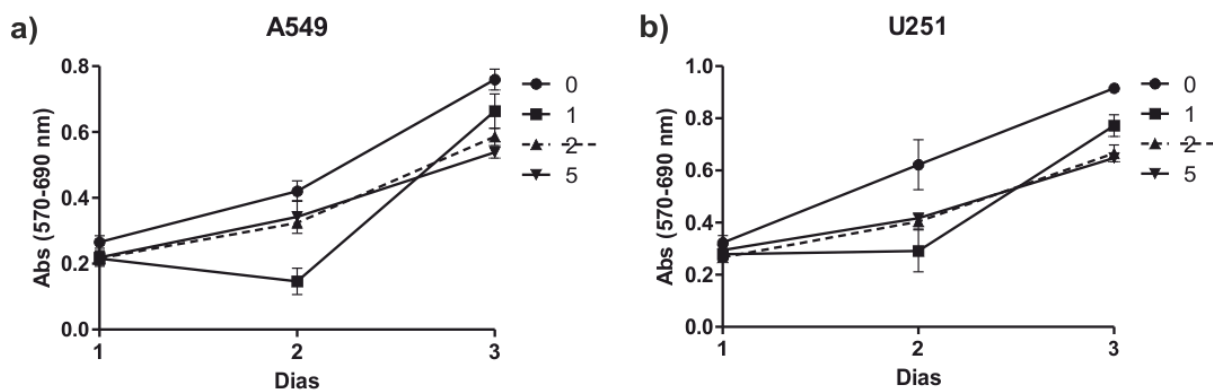


Figura 6. Ensayo de actividad metabólica celular por MTT. (a y b) Distribución de absorbancias medidas en un periodo de tres días. Los datos se expresan como la media \pm SD.

Se realizó un test ANOVA para evaluar la relación entre los factores tiempo, dosis y el efecto de la interacción entre ambos. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Test ANOVA del ensayo de actividad metabólica celular por MTT

Línea celular	Fuente	Suma de cuadrados tipo III	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
A-549	Modelo corregido	1,331 ^a	11	0,121	124,981	0,000
	Intersección	5,511	1	5,511	5690,481	0,000
	Tiempo	1,121	2	0,560	578,778	0,000
	Dosis	0,104	3	0,035	35,870	0,000
	Tiempo*Dosis	0,106	6	0,018	35,870	0,000
	Error	0,023	24	0,001	18,27	0,000
	Total	6,865	36			
	Total corregida	1,355	35			
U-251	Modelo corregido	1,640 ^b	11	0,149	83,275	0,000
	Intersección	8,693	1	8,693	4853,830	0,000
	Tiempo	1,328	2	0,664	370,868	0,000
	Dosis	0,199	3	0,066	37,067	0,000
	Tiempo*Dosis	0,113	6	0,019	10,514	0,000
	Error	0,043	24	0,002		0,000
	Total	10,376	36			
	Total corregida	1,683	35			

a. $R = 0,983$ (R cuadrado corregida = 0,975)

b. $R = 0,974$ (R cuadrado corregida = 0,963)

El p-valor asociado es menor que 0.05, de manera que el modelo explica una parte significativa de la variación observada en la variable dependiente “absorbancia” en ambas líneas celulares. Los valores R^2

= 0.983 y $R^2 = 0.974$ indican que los tres efectos incluidos en el modelo (dosis, tiempo y tiempo*dosis) están explicando el 98.3% y el 97.4% de la varianza de la variable dependiente de “absorbancia” en la línea A-549 y U-251 respectivamente. Los p-valores observados menores que 0.05, indican que los grupos definidos por “dosis” poseen valores de absorbancia medios significativamente diferentes, y que las absorbancias medias entre los distintos valores de “tiempo”, son significativamente diferentes también. En el caso de la interacción tiempo*dosis, el p-valor es inferior a 0.05, por lo que el efecto de la interacción es significativo. Esto indica que las diferencias observadas para la variable “tiempo” no son las mismas en las distintas dosis aplicadas.

Posteriormente se realizó un test de comparaciones múltiples de Dunnett para detectar diferencias entre las medias para cada condición. Los resultados para la condición “tiempo” se muestran en la Tabla 6 y los resultados para “dosis” en la Tabla 7.

Tabla 6. Comparación múltiple por Dunnett centrada en la variable Tiempo

	Tiempo (I)	Tiempo (J)	Diferencias entre medias (I-J)	Error típico	Significación	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
A-549	2	1	0,079*	0,012	0,000	0,049	0,109
	3	1	0,407*	0,012	0,000	0,377	0,437
U-251	2	1	0,143*	0,172	0,000	0,102	0,183
	3	1	0,459*	0,172	0,000	0,419	0,500

Basado en las medias observadas. *. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla 7. Comparación múltiple por Dunnett centrada en la variable Dosis

	Dosis (I)	Dosis (J)	Diferencias entre medias (I-J)	Error típico	Significación	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
A-549	1	0	-0,140*	0,014	0,000	-0,177	-0,103
	2	0	-0,107*	0,014	0,000	-0,143	-0,070
	5	0	-0,115*	0,014	0,000	-0,152	-0,078
U-251	2	0	-0,172*	0,199	0,000	-0,222	-0,122
	3	0	-0,175*	0,199	0,000	-0,225	-0,125
	5	0	-0,167*	0,199	0,000	-0,217	-0,117

Basado en las medias observadas. *. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Con el tiempo se va incrementando la absorbancia con diferencias estadísticamente significativas a los 2 y 3 días respecto al día 1 ($P > 0.001$) en ambas líneas. A un tiempo determinado, la absorbancia tiende a disminuir a medida que se incrementa la dosis de radiación aplicada.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

1.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se ha evaluado del efecto de la radiación en dos líneas celulares de cáncer de pulmón y de glioblastoma multiforme humano. Es interesante el estudio radiobiológico de ambas líneas debido a sus implicaciones clínicas, ya que ambas se encuentran entre los tipos de cáncer con mayor tasa de mortalidad entre los tumores diagnosticados. El glioblastoma multiforme humano es el más frecuente y maligno de los diferentes tipos de gliomas, constituyendo cerca del 50% de todos los gliomas y el 25% de los tumores intracraneales diagnosticados (Franco-Hernández C. *et al.*, 2007), mientras que el carcinoma de pulmón presentó en 2018 más de 230.000 casos nuevos y más de 154.000 muertes solo en Estados Unidos, constituyendo el 13% de los nuevos diagnósticos de cáncer (Long L. *et al.*, 2019). La importancia de estos tumores radica en la localización anatómica en la que se desarrollan y en la proximidad de órganos vitales que pueden verse afectados en el transcurso de la patología, de manera que los pacientes afectados presentan menores tasas de supervivencia a corto y largo plazo que en otros tipos de cáncer, menor calidad de vida y mayor incapacitación, debido principalmente a los procesos metastásicos derivados y a los órganos afectados.

En los resultados obtenidos tras los ensayos funcionales realizados a distintas dosis de radiación con la línea celular A-549, se puede observar una clara tendencia a la disminución de la fracción de supervivencia, derivando en la formación de un menor número de colonias, que además presentan menor área superficial a medida que se incrementa la dosis de radiación. Este hecho indica una disminución en la capacidad de proliferación de las células debida a daños producidos durante la interacción con la radiación. Por otro lado, el resultado de la irradiación de la línea U-251, también muestra una disminución en la fracción de supervivencia a medida que incrementa la dosis de radiación aplicada, al igual que se observa una disminución en el tamaño medio del área de colonias, que pese a presentar un aparente incremento tras irradiar con 1 Gy, a 5 Gy desciende significativamente en el área de superficie de las colonias formadas (Figura 5). Este incremento observado inicialmente en el tamaño de la superficie de las colonias al ser irradiadas a 1 Gy podría deberse a la agresividad que presenta la línea celular de glioblastoma multiforme humano, que a bajas dosis de radiación puede incrementar su capacidad proliferativa como mecanismo de defensa, fruto de la activación de mecanismos moleculares de reparación y proliferación, tal y como se ha observado en estudios previos (Michael, J. *et al.*, 1993). Estudios recientes, indican que los mecanismos moleculares implicados en la defensa frente a radiaciones podrían involucrar a micro-ARNs que regulan la expresión de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular (Long L. *et al.*, 2019). Es importante mencionar que algunas células tienen la capacidad de formar “minicolonias” tras recibir radiación debido a que conservan capacidad clonogénica limitada para proliferar durante unas pocas generaciones, tras lo cual, acaban muriendo (Michael, J. *et al.*, 1993) por ello, no se consideran supervivientes al tratamiento y no se han incluido

en el análisis de los resultados (Guzmán C. *et al.*, 2014). Este fenómeno se explicaría por la acumulación de daños en el material genético de las células irradiadas que disminuyen su capacidad proliferativa.

Los resultados obtenidos en los ensayos de supervivencia celular realizados parecen indicar que las células de glioblastoma multiforme humano son más resistentes a la radiación que las células de carcinoma pulmonar, lo cual se puede corroborar al comparar los parámetros α , β y la relación α/β en ambas líneas. Los parámetros obtenidos en este estudio concuerdan con los valores obtenidos para ambos tipos de tumores en ensayos previos (Leeuwen C. *et al.*, 2018). Se aprecian diferencias en la relación α/β que indican que la línea celular U-251 presenta menor sensibilidad al efecto de la radiación y una mayor resistencia al tratamiento que la línea celular A-549, ya que muestra un índice α/β superior. Este hecho indica que se necesitarán dosis más altas de radiación para conseguir la misma tasa de muerte celular por acumulación de daños subletales en U-251, que la requerida por la línea de cáncer de pulmón. Actualmente, las condiciones de radioterapia que se emplean para cada tipo de tumor en pacientes son, para el caso del carcinoma pulmonar, irradiaciones de 9 Gy (Shah J. *et al.*, 2018) de media, mientras que para el glioblastoma multiforme humano se recurre a tratamientos de 60 Gy fraccionados en 30 sesiones (Aznar M.C. *et al.* 2018). Sin embargo, es necesario considerar la posibilidad de repetir los ensayos de supervivencia celular con un mayor rango de dosis, con el objetivo de estimar con mayor precisión los parámetros α y β , de manera que se aprecie con mayor claridad la curvatura y la tendencia decreciente de SF en escala logarítmica (Figura 5).

Los ensayos de actividad metabólica celular por reducción de MTT, indican que la radiación afecta a ambos tipos celulares de manera similar, disminuyendo su viabilidad celular a dosis crecientes de radiación respecto al control negativo sin irradiar, tal y como era de esperar. Es destacable el caso observado tras la irradiación a 1 Gy en ambas líneas, ya que se aprecia una parada mitótica antes de comenzar a proliferar (Figura 6). Estos resultados indican que las células estudiadas parecen sufrir un proceso de adaptación a bajas dosis de radiación donde activarían mecanismos de defensa a radiación antes de sufrir una rápida proliferación celular (Long L. *et al.*, 2019), de manera que se descartaría el tratamiento a bajas dosis de radiación en clínica. En el caso de las células A-549, se observa un valor de absorbancia ligeramente inferior al observado el día 1, lo cual podría deberse a una mayor cantidad de células muertas por la radiación, sin descartar la posibilidad de que sea un error técnico. Sin embargo, las células U-251 presentan un valor de absorbancia similar al observado el día 1, lo cual podría deberse a la menor radiosensibilidad que presenta esta línea, de manera que tiene mayor resistencia al tratamiento y una menor tasa de muerte celular que la línea de carcinoma pulmonar para la misma dosis. Para corroborar si realmente ocurre esta aparente parada mitótica producida a dosis de 1 Gy o si se trata de errores técnicos, se sugiere replicar los ensayos realizados. La absorbancia en ambas líneas celulares presenta una tendencia similar a 2 y 5 Gy, con valores de absorbancia superiores en la línea U-251 y con una ligera diferencia a los tres días en ambas líneas, donde las poblaciones irradiadas con 5 Gy sufren un ligero descenso en el valor de absorbancia medido respecto a la población irradiada con 2 Gy

(Figura 6). Estos resultados sugieren la posibilidad de realizar estudios de la medida de MTT a tiempos más largos tras la irradiación, para observar posibles diferencias entre las poblaciones tratadas a 2 y 5 Gy con mayor precisión.

En general, los resultados obtenidos *in vitro* aportan información de gran valor para la realización de futuros estudios *in vivo* con ambas líneas celulares. En un futuro, este trabajo se puede ampliar modificando las condiciones de irradiación mediante la manipulación del parámetro LET, realizando diferentes tipos de cultivos 3D como los esferoides que simulan el tejido en su estructura tridimensional y realizando ensayos celulares empleando técnicas como la citometría de flujo para evaluar la radiosensibilidad de las células en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentran. Posteriormente se llevarían a cabo los mismos experimentos *in vitro* empleando protones en lugar de rayos X, para finalmente realizar ensayos *in vivo* en modelos animales murinos. Sería necesario también profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la defensa de las células tumorales frente a la radiación.

2.- CONCLUSIONES

- Las líneas celulares A-549 y U-251 tienden a formar menos colonias y de menor área superficial a medida que se incrementa la dosis de radiación aplicada.
- La línea celular U-251 presenta mayor resistencia a la radiación que la línea celular A-549 tal y como se observa en la diferencia de valores del índice α/β .
- A las dosis estudiadas, las células supervivientes a la irradiación continúan proliferando en el tiempo.
- Las líneas celulares estudiadas, tras ser irradiadas a 1 Gy, realizan una parada del ciclo celular por retraso mitótico seguida de una fase de proliferación.
- Para determinar con mayor fiabilidad los parámetros α y β habría que repetir los ensayos de supervivencia celular aumentando el rango de dosis de radiación aplicada.
- Para apreciar posibles diferencias entre las poblaciones tratadas a 2 y 5 Gy en los ensayos MTT, se sugiere la replicación de los experimentos realizados, pero con mediciones de absorbancia a tiempos más largos.

CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA

- Angius F., & Floris A. (2015). Toxicology in Vitro Liposomes and MTT cell viability assay. *Toxicology in Vitro*, 29(2), 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.11.009>
- Aznar M. C, Duane F. K. Darby P., Sarah C. Wang, Z., Taylor, C. W. (2018) Exposure of the lungs in breast cancer radiotherapy: A systematic review of lung doses published 2010–2015, *Radiotherapy and Oncology*, 126(1), pp. 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.11.022>.
- Blanchard P., Gary Brandon G., Alexander L., Robert L. F., Nancy Y. L., and Steven J. F. (2018). Proton Therapy for Head and Neck Cancers. *Seminars in Radiation Oncology* 28 (1): 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2017.08.004>.
- Bravatà V., Francesco P., Cammarata, L. Minafra, P. Pisciotta, C. Scazzone, L. Manti, G. Savoca. (2019). OUP Accepted Manuscript. *JouARNI of Radiation Research*, 1–15. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrz017>.
- Buch K., Peters T., Nawroth T., Sängler, M., Schmidberger, H., & Langguth, P. (2012). Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. *Radiation Oncology*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-1>
- Carlyle B. S. (2010), *Radiobiología molecular y celular*. In: *Manual de Radiobiología para Técnicos*. p. 520–533.
- Donald J. & E Alan. (2015). *Lineal-Quadratic Radiobiology*. p. 470-531
- Elias H., & Richter, A. (1982). G. Friedlander, J. W. Kennedy, E. S. Macias und J. M. Miller: *Nuclear and Radiochemistry*. 3. Auflage, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, New York 1981. 684 86(7), 690–691. <https://doi.org/10.1002/bbpc.19820860724>
- Franco-Hernández C., Martínez-Glez, V., & Rey, J.A. (2007). *Biología molecular de los glioblastomas*. *Neurocirugía*, 18(5), 373-382. Recuperado en 16 de junio de 2019, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-14732007000500001&lng=es&tlng=es
- Franken N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
- Friedlander, G., Kennedy, J.W., Macias, E.S., Miller, J.M. (1981). *Nuclear Reaction*. In: *Nuclear and Radiochemistry*. John Wiley and Sons. 3ª ed. New York
- Guerrero R., Guirado Llorente D., José Manuel de la Vega Fernández, Manuel Vilches Pacheco, and Amadeo Wals Zurita. 2008. Vol 8. *Radiobiología y Principios de Oncología - SEFM*.

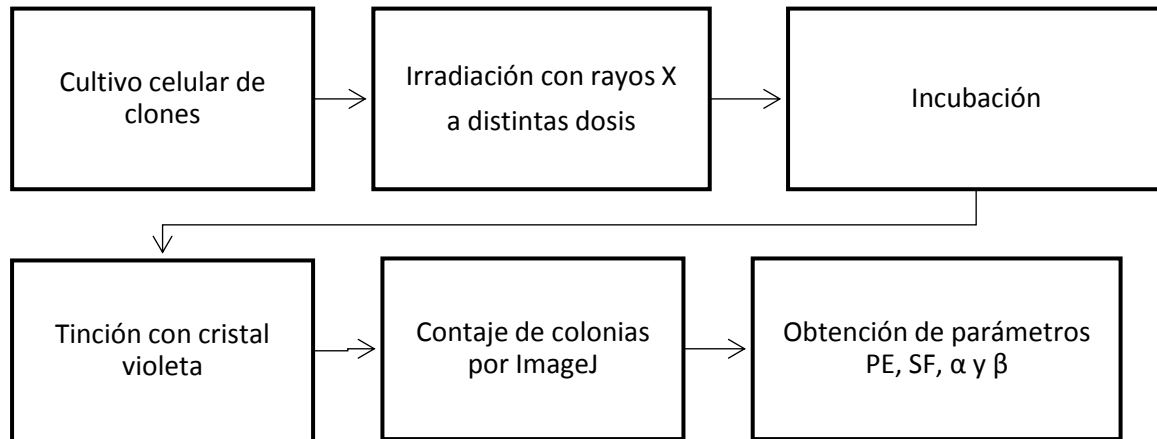
- Guzmán C., Bagga, M., Kaur, A., Westermarck, J., & Abankwa, D. (2014). ColonyArea: An ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. *PLoS ONE*, 9(3), 14–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092444>
- Iwadata Y., Mizoe, J. E., Osaka, Y., Yamaura, A., & Tsujii, H. (2001). High lineal energy transfer carbon radiation effectively kills cultured glioma cells with either mutant or wild-type p53. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 50(3), 803–808. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(01\)01514-0](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(01)01514-0)
- Jones B., McMahon S. J., and K. M. Prise. (2018). The Radiobiology of Proton Therapy: Challenges and Opportunities Around Relative Biological Effectiveness. *Clinical Oncology* 30 (5): 285–92. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2018.01.010>.
- Kammerer E., Le Guevelou J., Abdulhamid C., Serge D., Julien G., Christelle L., Eric S., Jean Louis Habrand, and Juliette Thariat. (2018). Proton Therapy for Locally Advanced Breast Cancer: A Systematic Review of the Literature. *Cancer Treatment Reviews* 63: 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.006>.
- Leeuwen C. van, A. L. Oei, J. Crezee, A. Bel, N. A.P. Franken, L. J.A. Stalpers, and H. P. Kok. (2018). The α and β of Tumours: A Review of Parameters of the Lineal-Quadratic Model, Derived from Clinical Radiotherapy Studies. *Radiation Oncology* 13 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13014-018-1040-z>.
- Lewicka K., Siemion P., & Kurcok P. (2015). Chemical Modifications of Starch: Microwave Effect. *International Journal of Polymer Science*, 2015(July), 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/867697>
- Long L. Zhang X., Bai J., Li Y., Wang X., Zhou, Y.. (2019) Tissue-specific and exosomal miRNAs in lung cancer radiotherapy: from regulatory mechanisms to clinical implications, *Cancer Management and Research*, Volume 11, pp. 4413–4424. doi: 10.2147/cmar.s198966.
- Michael J., van der Kogel A, Baumann M, Begg AC, Bentzen SM, Dörr W, Grégoire V, *et al.* (1993). *Basic Clinical Radiobiology*.
- Michaelidesová A., Jana V., Monika P., Kateřina P. B., Vladimír V., Lembit S., Marie D. (2017), *Australasian Physical & Engineering Sciences in Medicine*, Volume 40, Number 2, Page 359
- Mohan R., Christopher R. Peeler, Fada Guan, Lawrence Bronk, Wenhua Cao, and David R. Grosshans. (2017). Radiobiological Issues in Proton Therapy. *Acta Oncologica* 56 (11): 1367–73. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1348621>.

- Morcillo M.A. (2018) V.1. Interacción de la radiación con la materia viva: Consecuencias moleculares y celulares. Aula Virtual CIEMAT 1-28 p.
- Paganetti H., (2015). American Association of Physicists in Medicine., In Das, I. J., In., & American Association of Physicists in Medicine. Principles and practice of proton beam therapy.
- Price P., and Trevor J. McMillan. (1990). Use of the Tetrazolium Assay in Measuring the Response of Human Tumor Cells to Ionizing Radiation. *Cancer Research* 50 (5): 1392–96.
- Pomp J., Wike, J. L., Ouwerkerk, I. J. M., Hoogstraten, C., Davelaar, J., Schrier, P. I., Brock, W. A. (1996). Cell density dependent plating efficiency affects outcome and interpretation of colony forming assays. *Radiotherapy and Oncology*, 40(2), 121–125. [https://doi.org/10.1016/0167-8140\(96\)01767-7](https://doi.org/10.1016/0167-8140(96)01767-7)
- Rafehi H., Christian Orłowski, George T. Georgiadis, Katherine Ververis, Assam El-Osta, and Tom C. Karagiannis. (2011). Clonogenic Assay: Adherent Cells. *JouARNI of Visualized Experiments*, no. 49: 1–4. <https://doi.org/10.3791/2573>.
- Sanz E. R. (2018). Desarrollo de un generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. Aplicaciones del ^{68}Ga en tomografía por emisión de positrones, 0–252.
- Schneider, C. A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012), "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", *Nature methods* 9(7): 671-675, PMID 22930834
- Schmitz T., & Ph, D. (1997). Physics Contribution Calculation of Relative Biological Effectiveness for proton beam using biological weighting functions, 37(3), 719–729.
- Shah J. L. Li, G., Shaffer, J. L., Azoulay, M. I., Gibbs, I. C., Nagpal, S., Soltys, S. G. (2018) Stereotactic radiosurgery and hypofractionated radiotherapy for glioblastoma, *Neurosurgery*, 82(1), pp. 24–34. doi: 10.1093/neuros/nyx115.
- Stepanenko A. & V. V. Dmitrenko. (2015). Pitfalls of the MTT Assay: Direct and off-Target Effects of Inhibitors Can Result in over/Underestimation of Cell Viability. *Gene* 574 (2): 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009>.
- Van Tonder A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>
- Yang S., Xu, J., Shao, W., Geng, C., Li, J., Guo, F., Zhang, X. (2015). Radiation-Induced Bystander Effects in A549 Cells Exposed to 6 MV X-rays. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(3), 877–882. <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0555-2>

APÉNDICES

APÉNDICE 1: esquemas del procedimiento general de los ensayos de clonogenicidad y MTT:

1.1 Ensayo de clonogenicidad



1.2 Ensayo de viabilidad celular - MTT

