



**"EFECTO COMPARADO DE LA RADIACION GAMMA
SOBRE FIBROBLASTOS HUMANOS DIPLOIDES
DERIVADOS DEL CULTIVO DE PULMON Y DE-
ADENOCARCINOMA MAMARIO"**

T E S I S

**QUE PRESENTA EL DR. DANIEL GONZALEZ SPENCER,
EN OPCION AL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE PATOLOGIA,**

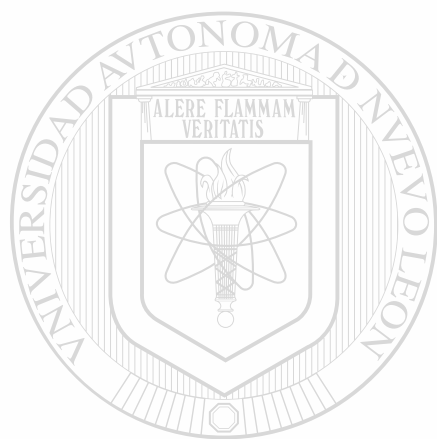
MAYO DE 1983

TM

QH585

G6

c. 1

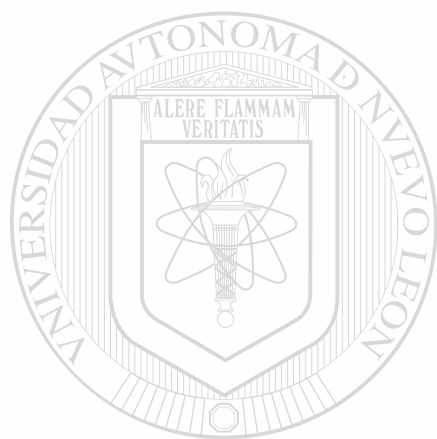


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



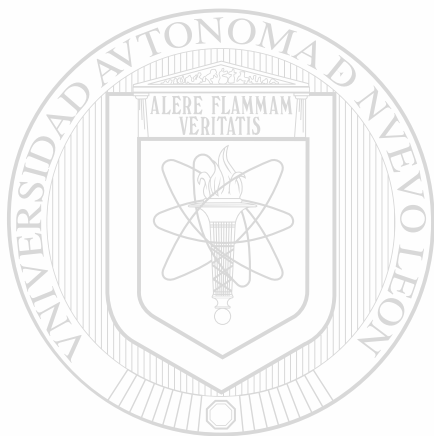
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



BIBLIOTECA

DUPLICADO

"EFECTO COMPARADO DE LA RADIACION GAMMA SOBRE FIBROBLASTOS
HUMANOS DIPLOIDES DERIVADOS DEL CULTIVO DE PULMON Y DE -
ADENOCARCINOMA MAMARIO"



T E S I S

UANL

QUE PRESENTA EL DR. DANIEL GONZALEZ SPENCER, EN OPCION AL
GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE PATO-
LOGIA.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

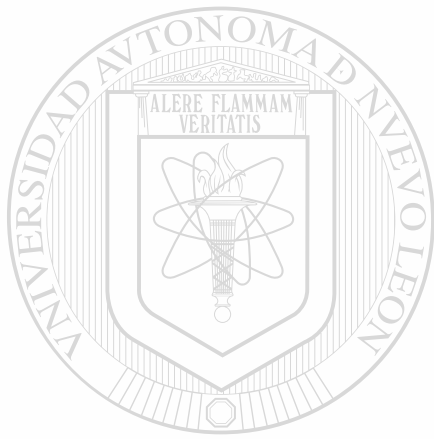
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE -
LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON.

MAYO DE 1983



B BL A

TM
QH585
56



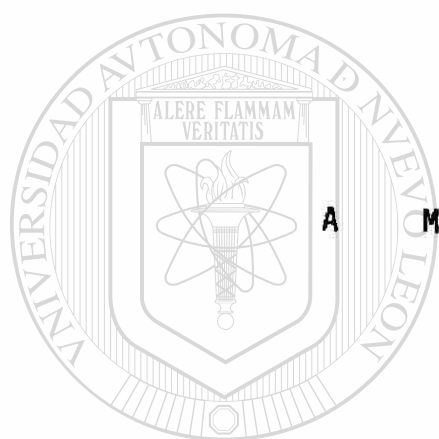
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





A MIS PADRES.

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

I. INTRODUCCION

a) Motivación	1
b) Objetivo	1
c) Antecedentes.....	2
1.- De cultivo de tejidos	2
2.- De radiobiología	12
d) Revisión bibliográfica	19

II. MATERIALES Y METODO

a) Material biológico	23
b) Material no biológico	25
c) Método de cultivo	25
d) Método de carioanálisis	28
e) Método de radiación y cuantificación	29

III. RESULTADOS

a) Resultados preliminares.....	32
b) Resultados de experimentación	39

IV. DISCUSION

43

V. CONCLUSIONES

46

VI. BIBLIOGRAFIA

48

I.- INTRODUCCION.

a) Motivación.

El estudio de las neoplasias malignas ha sido un tremendo reto a la inteligencia humana, pero es alentador saber que esa obscuridad que rodea a la etiopatogené^sis del cáncer está siendo penetrada por pequeños destellos de entendimiento que brotan de los centros de investigación tumoral. Cada aportación, que aisladamente parece ser pequeña, contribuye al mejor conocimiento de la biología de las neoplasias; su origen, su evolución y su resolución.

El estudio de la célula neoplásica propiamente dicha, ha acaparado la atención de los investigadores y son casi innumerables los reportes de experiencias a este nivel. Sin embargo, aunque el oncocito es la "estrella" de la neoplasia, es bien sabido que su desarrollo y propagación es imposible sin la ayuda del tejido corporal especializado en soporte y nutrición.

El estudio del estroma tumoral está lejos de ser completo y es propósito de este autor, incursionar en este campo, buscando la buenaventura de aportar un conocimiento nuevo.

Siendo el fibroblasto la célula principal del tejido conectivo, se enfocará la atención sobre el y se estudiará su respuesta frente a un reto, en este caso: la radiación gamma.

b) Objetivo.

El objetivo de esta tesis es determinar si existe una radiosensibilidad diferente entre los fibroblastos del estroma de un órgano sano y los fibroblastos del estroma de una neoplasia maligna.

c) Antecedentes

Aunque la radiobiología ha sido estudiada extensamente - en fibroblastos obtenidos por cultivo de tejidos embrionario, fetal y adulto de origen animal y de origen humano, (2,3,4,12, 17,18,19) es de interés notar que tanto la disciplina de cultivo de tejidos así como la radiobiología y la radiobiopatología, han sido prácticamente desconocidos en nuestro medio. Este aparente vacío de conocimientos en esta rama de las ciencias biomédicas, ha hecho manifiesta la necesidad de dominar la técnica de cultivo tisular para aplicarla posteriormente al estudio de la radiobiología tumoral. Conviene pues, exponer algunos principios básicos del cultivo de tejidos y de la radiobiología para la mejor comprensión de esta tesis.

1) Antecedentes de cultivo de tejidos.

En experimentación tisular se ha utilizado extensamente como modelo de tejido normal a los fibroblastos de tipo diploide (no alterados), los cuales tienen un tiempo limitado de vida *in vitro* (32). Se ha observado que si estos fibroblastos conservan su estado diploide, el número de duplicaciones que pueden llevar a cabo *in vitro*, varían en relación inversa a la edad del tejido de origen (12) y que la capacidad finita de éstos cultivos de duplicarse, es una manifestación de envejecimiento a nivel celular (9,11). En su estudio clásico, Hayflick (11) estableció que el potencial de doblaje para tejido fetal era de 50 ± 10 doblajes; cinco años más tarde, Martín, Curtis y Sprauge (21) calcularon el coeficiente de regresión para donadores entre la primera y novena décadas de la vida. Este coeficiente de regresión se expresó como de -0.2 doblajes por año, con una desviación estandar de 0.05 y con un coeficiente de correlación de -0.5 . Se demostró que este coeficiente de regresión era significativamente diferente a cero.

A mayor edad cronológica del donador, menor la cantidad de doblajes que puede llevar a cabo su tejido *in vitro*. Esta reducción del potencial de replicación no es función única de la edad cronológica del donador sino además se ve influida por otros factores como son genotipo y exposición actínica (8).

Puesto que la disciplina de cultivo de tejidos se desarrolló en diversas escuelas, los términos que usaron los investigadores para nombrar un mismo fenómeno fueron distintas. Esto produjo confusión y no fué sino hasta 1961 en que Hay---flick y Moorhead (12) propusieron términos que fueron aceptados en forma general. Estos términos describieron cuatro características de los tejidos cuando son cultivados *in vitro*: células primarias, la cepa celular, la línea celular y la alteración celular.

Células primarias: Son aquéllas células obtenidas del explante original que han sido cultivadas *in vitro* por primera intención. Si se efectúan pasajes subsecuentes de estas células, estas llegarán a ser cepas celulares.

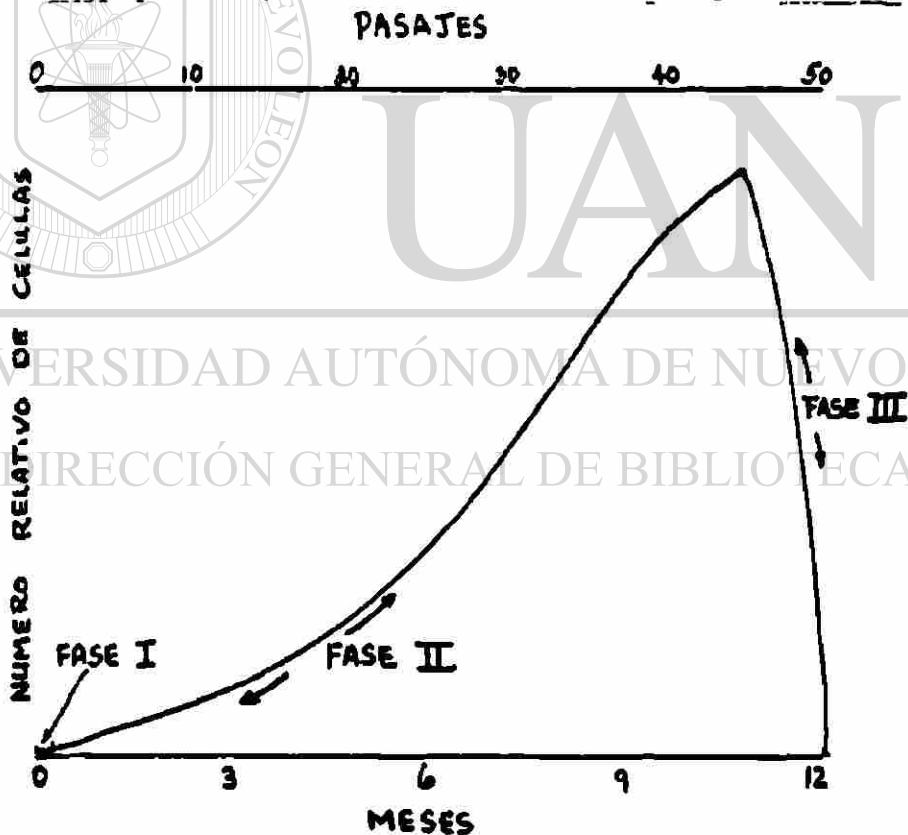
Cepas celulares: Se entiende por cepa celular aquélla población de células derivadas del cultivo de explante, que hayan sido subcultivadas más de una vez *in vitro*; su número de replications es finito, no teniendo la capacidad de sufrir pasajes seriados por tiempo indefinido. Estas células conservan el número cromosómico modal que caracteriza al tejido de origen.

Líneas Celulares: Se entiende por línea celular aquélla población de células cultivadas *in vitro* mediante pasajes seriados por tiempo indefinido, con un cambio del número modal de cromosomas que caracteriza al tejido de origen. Por esta razón, los términos "línea celular establecida" y "línea celular estable" no deberan usarse, puesto que el primero es redun

dante y el segundo implica que ya no pueden ocurrir más cambios en el tejido cultivado.

La Alteración Celular: Es el cambio que sufre la cepa celular al pasar del estado diploide al heteroploide, adquiriendo la capacidad de sufrir pasajes seriados por tiempo indefinido. La alteración celular puede ocurrir durante la fase de crecimiento exponencial o logarítmico que ha sido nombrada como fase II.

El crecimiento de tejido in vitro no es siempre igual -- sino que pasa a través de diferentes modalidades de desarrollo. Hayflick llamó "fases" a tres distintas etapas evolutivas de los cultivos, mismas que se resumen en la siguiente gráfica:



Gráfica No. 1.- Representación gráfica de fases de crecimiento tisular en cultivo (Hayflick).

Fase I: Es la fase de crecimiento temprano que se inicia con la liberación de células del tejido y su adherencia a la superficie del frasco de cultivo. En general esta fase dura de una a tres semanas. La fase I termina con la formación de la primera capa confluyente. En este momento el cultivo está listo para la primera dis o s i o n y subcultivo ("pasaje").



Figura No. 1. Fase I. Explante rodeado de crecimiento de células primarias. 3.5X



Figura No.2. Fase I. Explante rodeado de mayor crecimiento --
primario pero aún sin confluencia en monocapa.10X

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

®



Figura No.3. Fase I. Explante rodeado de monocapa confluyente.
Fijado, H y E. 10X

Fase II: La fase II se caracteriza por una rápida multiplicación celular, (crecimiento exhuberante, crecimiento exponencial) con gran actividad metabólica y producción de ácidos. Durante esta fase, el cultivo deberá someterse a dos pasajes por semana con una proporción de reducción de 2 a 1. (Vg. de un frasco original se obtendrán dos frascos por pasaje). El éxito del cultivo prolongado de células diploides depende de que se mantenga el cultivo en esta fase de crecimiento logarítmico el mayor tiempo posible; esto se logra con pasajes repetidos tan pronto como confluyan las monocapas. Si no se efectúa un pasaje oportunamente; el cultivo "envejece" y se inicia la formación de estratificaciones o pluricapas. La fase II dura aproximadamente 2 a 10 meses. Al irse terminando este período se inicia la degeneración celular que anuncia la llegada de la fase III o fase terminal.

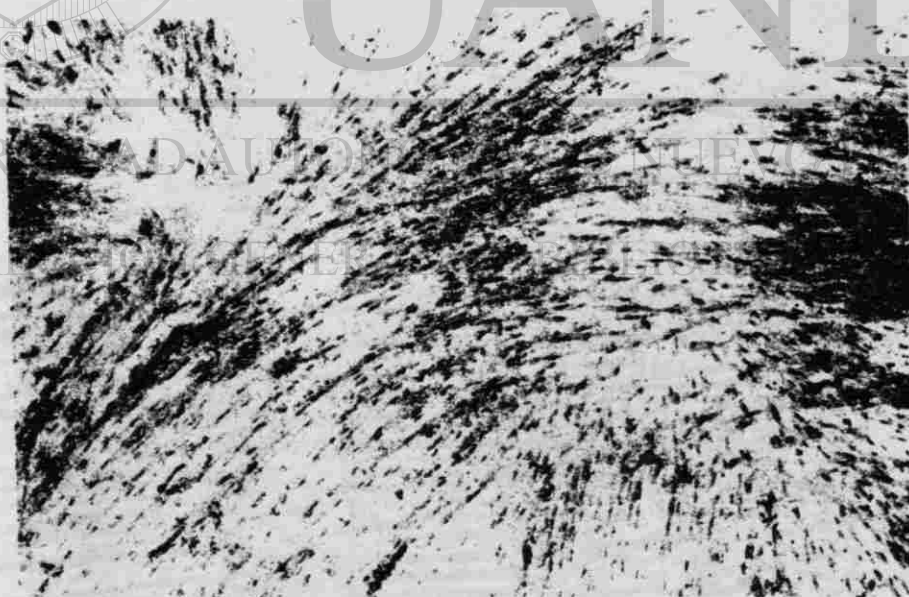


Figura No.4. Fase II. Monocapa confluyente durante fase de crecimiento logarítmico. Fijado, H y E. 10X

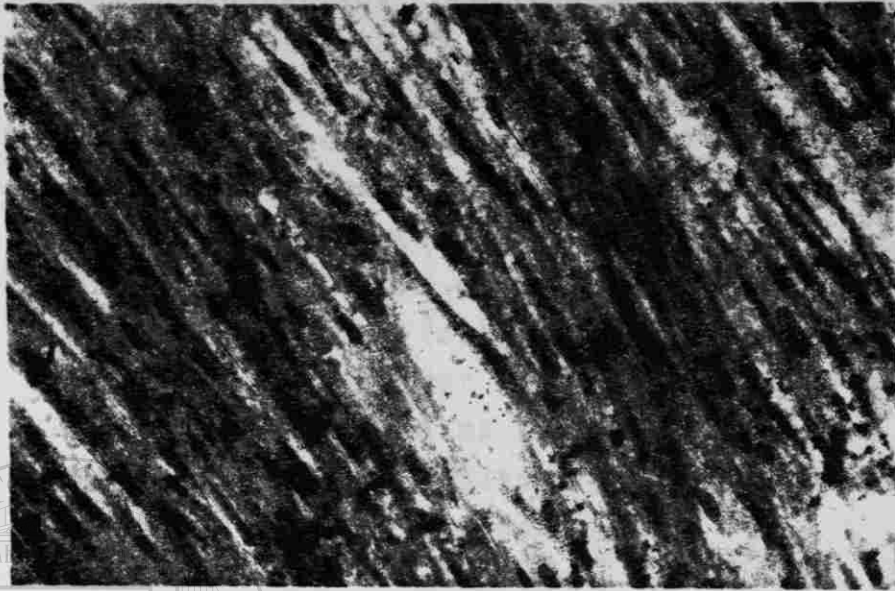


Figura No.5. Fase II. Monocapa confluyente durante crecimiento logarítmico. Fijado H y E. 40X

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

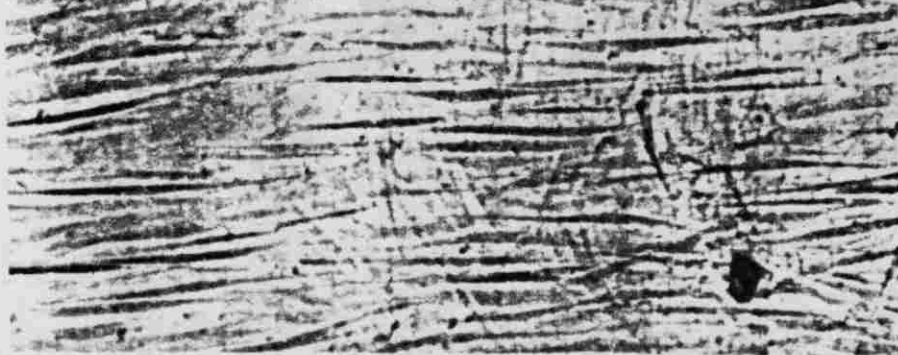


Figura No.6. Fase II. Pluricapa temprana que muestra superposición celular. Tejido vivo, 40X

Fase III: La fase III se caracteriza por la aparición de cambios degenerativos. Empieza a acumularse detrito celular, se alarga el tiempo de generación y se reduce la actividad mitótica; consecuentemente se alarga el período de tiempo necesario para el desarrollo de monocapas confluentes. Empiezan a observarse cambios en la morfología nuclear y celular, habiendo pérdida de la orientación celular y pérdida de la capacidad de duplicación celular por el fenómeno de inhibición por contacto entre membranas celulares. El citoplasma se vuelve granuloso y en él aparecen grandes vacuolas. El cultivo decae progresivamente hasta desaparecer.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIONES

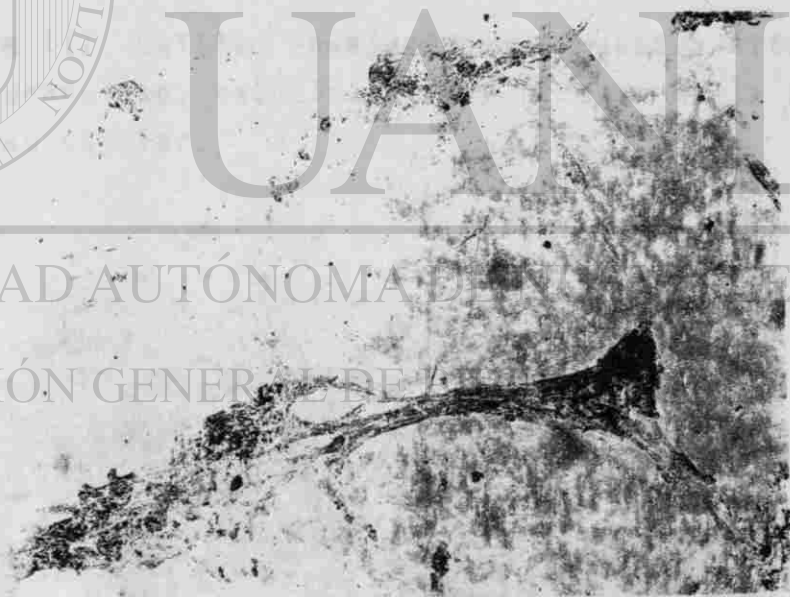


Figura No. 7. Fase III. Cultivo envejecido que muestra fenómenos degenerativos. Tejido vivo, 10X

Figura No. 7. Fase III. Cultivo envejecido que muestra fenómenos degenerativos. Tejido vivo, 10X



Figura No.8. Fase III. Cultivo envejecido que muestra citoplasma granuloso, vacuolización y pérdida de la polaridad celular.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN



Figura No.9. Fase III. Cultivo envejecido que muestra pérdida de la inhibición por contacto resultando un apilamiento celular. Tejido vivo 10X

En el presente estudio se trabajó exclusivamente con cultivos que se encontrasen en la Fase II de crecimiento exponencial, (figuras 4 y 5) manipulados en la forma descrita por Deschavanne (4) para obtener mesetas de crecimiento ("plateau -- fase"). Esto se logró manteniendo sin nueva alimentación por quince días a las monocapas ya confluentes. En estas mesetas, la monocapa es aún vigorosa pero no se encuentra en activa replicación, puesto que el fenómeno de contacto entre membranas celulares produce inhibición de la división celular. De esta manera el tejido en cultivo se semeja más al tejido in vivo y los resultados de la experimentación hecha en esta fase de meseta, reflejarán con más fidelidad lo que realmente ocurre in vivo.

2) Antecedentes de Radiobiología.

En radiobiología se han utilizado experimentalmente tanto la radiación electromagnética (rayos X y rayos gamma) como la radiación de partículas. Algunas partículas tienen carga (alfa, beta, protones, mesones-pi y iones pesados) y otras carecen de ellas (neutrones) (14).

Se ha observado que los efectos cualitativos de los diferentes tipos de radiación son similares entre sí, pero que existe una gran variedad de patrones de liberación de energía dentro de los tejidos expuestos a la radiación. Las fuentes neutras como son los rayos X y los rayos gamma, pierden energía a medida que penetran niveles más profundos de tejido, debido a que sufren colisiones poco frecuentes y al azar con los átomos que constituyen al tejido. Estas colisiones poco frecuentes y al azar con los átomos que constituyen al tejido. Estas colisiones pueden llevar a una reducción casi de tipo exponencial en su energía. Sin embargo, este tipo de radiación alcanza una buena penetración a los tejidos profundos. Las partículas cargadas alfa, beta, protones y mesones-pi, pierden

energía por colisiones múltiples con los electrones del material irradiado. Estas colisiones sustraen energía hasta que la partícula se detiene. El patrón de liberación de energía de estas partículas es constante. Por esta razón, la radiación de partículas tiene una baja capacidad de penetración. Cuando la partícula se acerca al final de su curso, se aumenta la cantidad de energía por unidad lineal del curso; a esto se le llama "transferencia de energía lineal" (LET). Este fenómeno conduce a un incremento local de dosis llamado "el pico de Bragg de ionización". La profundidad que pueden alcanzar estas partículas depende de su energía inicial. Las partículas beta llegan a penetrar unos cuantos milímetros de tejido mientras que las partículas alfa penetran mucho menos. Sin embargo, si estas partículas son aceleradas en un ciclotrón, estas pueden llegar a penetrar hasta más de 20 cms. de tejido.

La "energía absorbida de la radiación en un gramo de tejido", se conoce como la "dosis". La unidad de dosis es el rad (r) que se define como "la absorción de 100 ergios de energía por gramo de material irradiado". La emisión de radiación de aparatos de rayos X se define en términos de exposición, siendo la unidad de medida el roentgen (R). Se define al roentgen como "aquella exposición que bajo condiciones determinadas liberase una unidad electrostática de iones positivos en un c.c. de aire". El aire expuesto a 1R de radiación, recibe una dosis de 0.87 rads. Además, se ha introducido una nueva medida de radiación; esta es el gray (Gy), el cual equivale a 100 rads. De esta manera, 1 centigray es igual a 1 rad.

Independientemente de cual sea la fuente de energía radiante, ésta ejerce un efecto biológico a través de la ionización de los átomos o moléculas celulares contra los cuales sufre colisión; el mecanismo completo mediante el cual se produce el efecto biológico es aún desconocido, pero se proponen dos teorías para explicar este mecanismo: la teoría directa o teoría de blanco y la teoría indirecta. La teoría directa supone

que el efecto de la radiación se produce por golpe directo a biomoléculas sensibles, como son los lazos de unión de una molécula de DNA (13,15). Esto no excluye la posibilidad de -- que el efecto biológico requiera múltiples blancos de acción o múltiples golpes a un solo blanco (27). La teoría indirecta propone que la radiación provoca la ionización del agua celular y la liberación de radicales libres "tóxicos" (H^+ , OH^- , etc.) que secundariamente interaccionan con elementos vitales como son los lípidos de membrana, las enzimas y los ácidos nucleicos (28,35,37,38).

Existe un enigma en radiobiología el cual ha sido conocido con el nombre de "efecto latente de radiación". Se entiende que la transferencia de energía a una molécula blanco ocurre en una microfracción de segundos, sin embargo su efecto biológico, morfológico o funcional pudiera no hacerse evidente -- sino hasta décadas después. Este fenómeno fue observado en los sobrevivientes de las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki, que desarrollaron neoplasias radiorelacionadas más de 20 años después del bombardeo (5,6,23,24). Aún no se ha dilucidado si este fenómeno implica reacciones intracelulares en secuencia -- que finalmente alcanzan a una molécula o una función crucial,® o si el primer evento físico químico es tan pequeño que su -- efecto es sólo detectable a través de la propiciación de mutaciones cada vez más severas en generaciones sucesivas de células.

Haciendo a un lado estas especulaciones, existen efectos de radiación sobre las células que sí han sido bien documentadas. Se sabe que la magnitud de la lesión celular provocada -- por la radiación depende de cuatro factores fundamentales. Estos son: la dosis, la rapidez de administración de la dosis, la transferencia de energía lineal (LET) de la radiación y la vulnerabilidad de la célula a la radiación (36).

Si todas las variables se mantienen en igualdad, la lesión celular es directamente proporcional a la dosis administrada. Sin embargo, la rapidez con la que se administra esta dosis modifica significativamente su efecto, especialmente cuando la dosis es fraccionada, como es común en radioterapia. Aunque la energía de radiación es acumulable, las células son capaces de reparar daño subletal hasta cierto límite. Esta capacidad de reparación puede estar muy disminuida en algunas variedades de células como es el caso de los pacientes con xeroderma pigmentosum. Estos individuos carecen de la endonuclease necesaria para eliminar dímeros inducidos por radiación ultravioleta y posiblemente otras enzimas necesarias para re-unificación de cabos rotos de la molécula de DNA. Al no poder reparar estos daños subletales, se acumulan mutaciones radio-inducidas que llevan a un incremento asombroso en la posibilidad de sufrir transformaciones malignas, sobre todo de la piel. En el individuo normal, si se permite el paso de suficiente tiempo entre la primera y la segunda irradiación, la célula pudiera reparar la mayor parte del daño subletal y de esa manera no sufrir efecto acumulativo (33). Por ende, las dosis fraccionadas solo ejercen efecto acumulativo si la reparación celular no se completa en el intervalo entre una dosis y otra.

En radioterapia de tumores se toma ventaja de este hecho, puesto que la reparación del daño subletal en la célula normal es más rápido que en la célula tumoral. De esta manera las células no neoplásicas no sufren el mismo efecto acumulativo que sufren las células tumorales, siendo entonces menos dañadas por exposiciones repetidas.

La transferencia de energía lineal (LET) influye sobre el efecto radiobiológico en sentido directamente proporcional. Al aumentar la LET, mayor es el efecto biológico o sea que se

requiere menor dosis para alcanzar un mismo efecto. La reparación del daño subletal también depende de la transferencia de energía lineal aunque en proporción inversa, puesto que entre mayor sea la LET menor será la capacidad de reparación. Una energía mayor conduce a una reparación celular baja y vice versa.

La vulnerabilidad de las células a la radiación es a su vez dependiente de diversos factores como son: la respuesta inherente de una célula a un pulso de radiación, la cinética de reparación celular, la oxigenación celular y el estado proliferativo de las células en el momento de recibir el pulso de radiación. Aún células de un mismo tipo y condición pueden presentar un rango amplio de severidad de lesiones a una misma exposición. La radiación no se absorbe uniformemente sino más bien al azar y por esta razón en unas células las ionizaciones pueden ser letales mientras que en otras el daño no es crítico. Una variable importante es el estado de oxigenación celular. Puesto que el oxígeno molecular presenta dos electrones no apareados, estos pueden interactuar con radicales libres radioinducidos, aumentando su efecto dañino. Este "efecto del oxígeno" es de particular importancia en el uso de radiación para la destrucción de tumores. Frecuentemente el centro de estos tumores es poco vascularizado y relativamente hipóxico y por lo tanto está "protejido" del efecto ionizante.

Aunque existen muchos sitios intracelulares de daño potencial, se acepta que la molécula de DNA es el blanco más vulnerable a la radiación. Por esta razón la inducción de necrosis post-radiación está íntimamente correlacionado con la actividad reproductiva de la célula. Esta vulnerabilidad varía marcadamente según la fase del ciclo celular en la cual se encuentre la célula. Se acepta que las fases M y G₂ del ciclo son

la más sensible (1,30). Si una célula está en mitosis al recibir el pulso de radiación, ésta puede seguir adelante y completar la división si la dosis no fué muy alta, pero puede resultar incapaz de sufrir nuevas divisiones (muerte reproductiva). Por estas razones, las neoplasias malignas poco diferenciadas de duplicación celular rápida, generalmente responden mejor a la radioterapia que las neoplasias bien diferenciadas de crecimiento lento. Este principio es aplicable a los diversos tipos de células corporales y los tumores que de ellas provengan. La radiosensibilidad de los diversos tipos celulares y sus tumores se compara en la siguiente tabla tomada de Rubín y Casarett (31).

RADIOSENSIBILIDAD DE CELULAS ESPECIALIZADAS
Y SUS TUMORES

Grado	Celulas normales	Tumores
Alto	Cel. linfoides, medulares, germinales, del epitelio intestinal y del foliculo ovarico	Leucemia- <u>linfoma</u> , - <u>seminoma</u> , tumor de <u>celulas granulosas</u> .
Mod.	Epitelio epidérmico, orofaríngeo, urinario, esofágico, gástrico y uretral	<u>Carcinoma espinoce-[®]lular</u> , transicional y adenocarcinoma.
Medio	Tejido conectivo, glia, endotelio y hueso y cartilago en crecimiento	<u>Fibrosarcomas</u> , <u>angio-<u>sarcomas</u></u> , <u>astrocitomas</u> . Estroma de <u>tumores</u> .
ReTat.	Cel. de cartilago y hueso maduras	<u>Condrosarcoma</u> , <u>osteosarcoma</u> , <u>liposarcoma</u> , <u>carcinoma espinoce-<u>lular</u></u> de pulmón y adenocarcinoma renal, hepático, etc.
Bajo	epitelio glandular y seroso, epitelio pulmonar, renal, hepático, pancreático, pituitario, tiroideo y suprarrenal.	
Bajo	Células musculares y ganglionares	<u>Rabdomiocarcinoma</u> , <u>leiomiocarcinoma</u> , <u>glioneuroma</u> .

Tabla No. 1.- Radiosensibilidad de células especializadas y sus tumores.

A pesar de ésta categorización, toda célula puede ser dañada o destruida con suficiente exposición a radiación ionizante.

El daño producido por radiación es visible tanto en el citoplasma como en el núcleo. La respuesta inicial se presenta como un edema celular con vacuolización del citoplasma; ultraestructuralmente aparece aumento del volumen de las mitocondrias así como hinchazón y fragmentación del retículo endoplásmico. Como dato curioso, los lisosomas son relativamente radioresistentes y en ocasiones parecen aumentar en número (7). Los núcleos se hinchan, sufren vacuolización y con mayor exposición presentan picnosis y cariorrexis. El envoltorio nuclear y la membrana celular pueden romperse al recibir dosis grandes de radiación. A nivel cromosómico puede verse gran diversidad de daño en las células que están dividiéndose; este consiste en deleciones, rupturas, translocaciones, interadherencias y fragmentaciones. Las figuras mitóticas pierden su orden adquiriendo aspecto caótico. Este daño al aparato genético constituye la base de la letalidad, oncogenicidad y mutagenicidad de la radiación. De hecho la radiación produce cambios nucleares y mitóticos que hacen que las células irradiadas se semejen a las células malignas; esto frecuentemente produce problemas al patólogo cuando éste hace una evaluación de tejido post-irradiación para determinar la presencia de tumor residual.

El daño por radiación repercutirá en una de las tres siguientes formas: ó mata a la célula; ó la incapacita para volverse a reproducir; ó la transforma (alteración celular).

Una buena parte del efecto de la radiación sobre los tejidos organizados se debe a los cambios que se producen en la vasculatura y en las células conectivas de esos tejidos. Durante el periodo post-irradiación temprano, los vasos suelen presentar dilatación, lo cual se hace evidente por el eritema

cutáneo. Con el aumento en dosis aparecen cambios del endotelio vascular caracterizados por hinchazón, vacuolización y aún destrucción completa. Los vasos más dañados pueden sufrir ruptura, trombosis y fibrosis progresiva con estrechamiento de la luz vascular. El tejido conectivo contiguo se hace progresivamente más escleroso. De ésta manera las células parenquimatosas son privadas de aporte oxígeno-nutricional y sufren atrofia y muerte (29).

La importancia de conocer mejor los cambios sufridos por el tejido conectivo vascularizado en la radioterapia de tumor es, así como el descubrimiento de que los fibroblastos no se comportan en forma idéntica independientemente del sitio de su origen (8), han influido en la motivación del presente estudio.

Se recuerda que el tejido conectivo vascularizado que forma el estroma de sostén de un tumor no es parte del proceso maligno mismo, pero es esencial para su desarrollo y propa gación. No se descarta la posibilidad de que éste tejido conectivo prolifera en respuesta a inductores de crecimiento li berados por las células malignas y que por esta razón los fi broblastos "tumorales" tienen información que otros fibroblastos "normales" no tienen, siendo esta información el resultado de la asociación e interacción con células malignas.

d) Revisión bibliográfica.

La literatura sobre radiobiología de fibroblastos es extensa. Los principales investigadores son:

Deschavanne, Fertil, Malaise y Lachet del Laboratorio de Radiobiología Celular del Instituto Gustave-Roussy, en Villejuif, Francia (4,10,18).

A.W. Malcom y J.B. Little, del Laboratorio de Radiobiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Harvard en Boston, Massachusetts, U.S.A. (19,20).

R. Cox, W.K. Masson, J. Thacker y D.T. Goodhead, de la Unidad de Radiobiología, Harwell, Oxon, Inglaterra (2,3,17).

C. Waldren, I. Rasco, del Instituto de Investigación Cancerológica de la Universidad de Colorado, Denver, Co., U.S.A. (35).

El grupo francés, Deschavanne, et. al., hizo una extensa revisión de la literatura y encontraron que no habfa sido reportado estudio comparativo entre fibroblastos irradiados en fase de crecimiento exponencial y fase de meseta no alimentada, resemebrados inmediatamente 7 24 horas después de recibir la radiación. Esto permitió deducir que éste campo de investigación era virgen y que faltaban estudios de éstas características con fibroblastos normales, lo más probable es que no hubiera estudio comparativo con fibroblastos derivados de tejido neoplásico.

~~Con ésta suposición en mente, se comunicó a través del sistema computarizado al Centro de Informática de Ciencias Biomédicas "Medline" en Baltimore, Maryland y se solicitó una revisión de la literatura publicada en un periodo de cinco años (anteriores a la fecha de soltitud) sobre fibroblastos derivados de estroma tumoral y experimentación radiobiológica con éste tipo de fibroblastos. Además se solicitó literatura sobre radiobiología fibroblástica general.~~

El material recopilado por el Centro de Informática "Medline" consistió en 25 artfculos sobre radiobiología general y ninguno sobre fibroblastos de origen tumoral ni su radiobiología. La necesidad de incursionar en este campo se hizo patente.

El grupo de Deschavanne, et. al., calculó la dosis letal

media (D_0) para fibroblastos normales, entre 100 y 160 rads y una media de 120 rads y un número de extrapolación (n) de 1.1. Recomendó el uso de la fase de meseta no alimentada para poder obtener resultados más relevantes a situaciones clínicas; comparó reparaciones de daño subletal en diferentes lapsos de tiempo entre la irradiación y la resiembra y experimentó con dosis fraccionadas en relación a reparación de daño subletal.

El grupo americano de Malcolm, Little, et. al., propuso la hipótesis de la necesidad de contacto entre membranas celulares para llevar a cabo la reparación de daño subletal producido por radiación gamma y calcularon el tiempo crítico de 10 minutos post-irradiación para que ocurriese esta reparación.

El grupo inglés de Cox, Masson, et. al., presentó una técnica de alimentación celular ("feeder cell technique") para aumentar la eficiencia de sembrado y de la capacidad formadora de colonias de fibroblastos; así mismo establecieron las densidades óptimas para sembrado. Además propusieron que los cultivos irradiados en pasajes tempranos tienen menor capacidad de reparar daño subletal que los cultivos de mayor "edad". Propusieron la existencia de un factor difusible presente en medio condicionado cuya función es de facilitar la reparación del daño subletal.

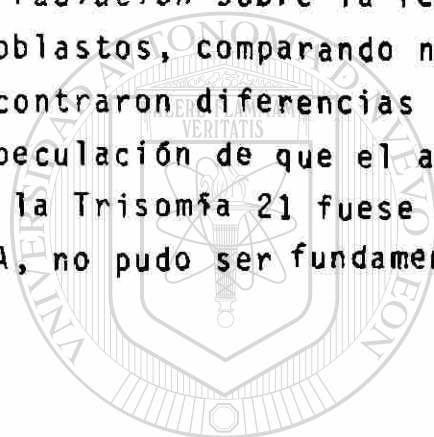
Otras contribuciones importantes fueron las de Martin, Curtis y Sprauge (21) sobre los efectos de la edad, tejido y genotipo del donador sobre el tiempo de vida duplicativa de células humanas en cultivo.

Barbara Gilchrist (8,9,) reportó sus experimentos sobre envejecimiento celular relacionado a radiación actínica tanto en fibroblastos como en queratinocitos.

Paterson, Anderson y Blake (25) reportaron el aumento de radiosensibilidad en fibroblastos de ataxia telangiectasia manifestados por defecto en la capacidad formadora de colonias y reducción de la capacidad de reparación del DNA al recibir irradiación γ en condiciones de hipoxia.

Weichselbaum, Nove y Little (37) reportaron un aumento de radiosensibilidad en pacientes con retinoblastoma.

Yotti, Glover, Trosko y Segal (19) estudiaron los efectos de radiación sobre la reparación del DNA y mutagénesis en fibroblastos, comparando normales contra síndrome de Down. No encontraron diferencias significativas en las respuestas. La especulación de que el alto riesgo de desarrollar neoplasias en la Trisomía 21 fuese debido a fallas en la duplicación de DNA, no pudo ser fundamentada.



U ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

II.- MATERIALES Y METODO

a) Material biológico.

Como fuentes de tejido se utilizaron piezas quirúrgicas frescas con diagnóstico anatómico de pulmón normal y de adenocarcinoma de glándula mamaria. El tejido pulmonar se obtuvo de un paciente del sexo masculino de 14 años de edad. Este tejido pulmonar fué etiquetado como cultivo C-82-23. El tejido neoplásico se obtuvo de una paciente del sexo femenino de 70 años de edad que desarrolló un cáncer de la glándula mamaria izquierda, diagnosticado como adenocarcinoma ductal infiltrante, moderadamente diferenciado, (A.P. Q-82-003). En el laboratorio de tejidos fué etiquetado como cultivo C-82-21.



Figura No. 10. Sección histológica de pulmón normal que muestra tejido conectivo vascularizado. HyE, 10X

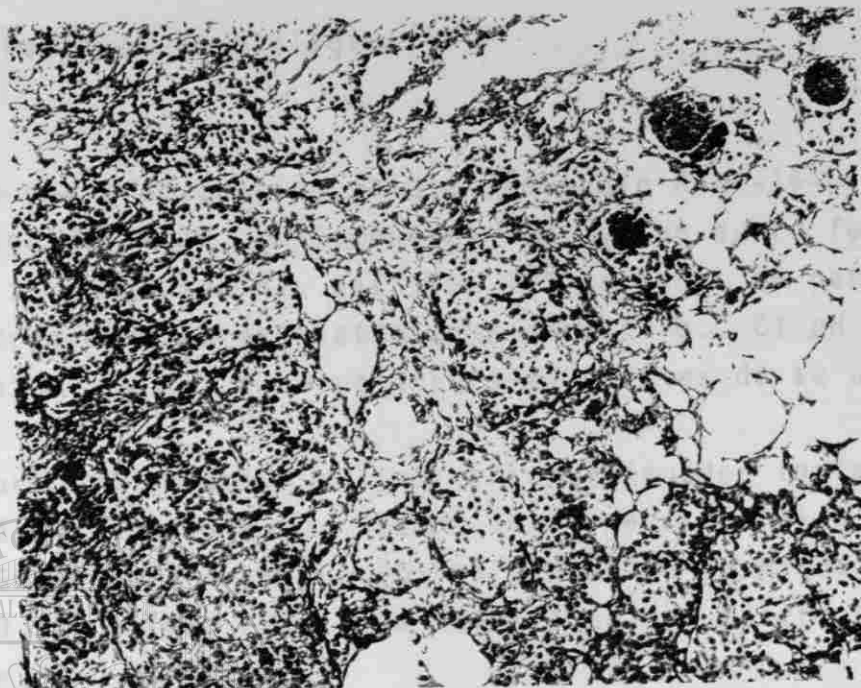


Figura No. 11. Sección histológica de adenocarcinoma ductal infiltrante de glándula mamaria. H y E, 10 X

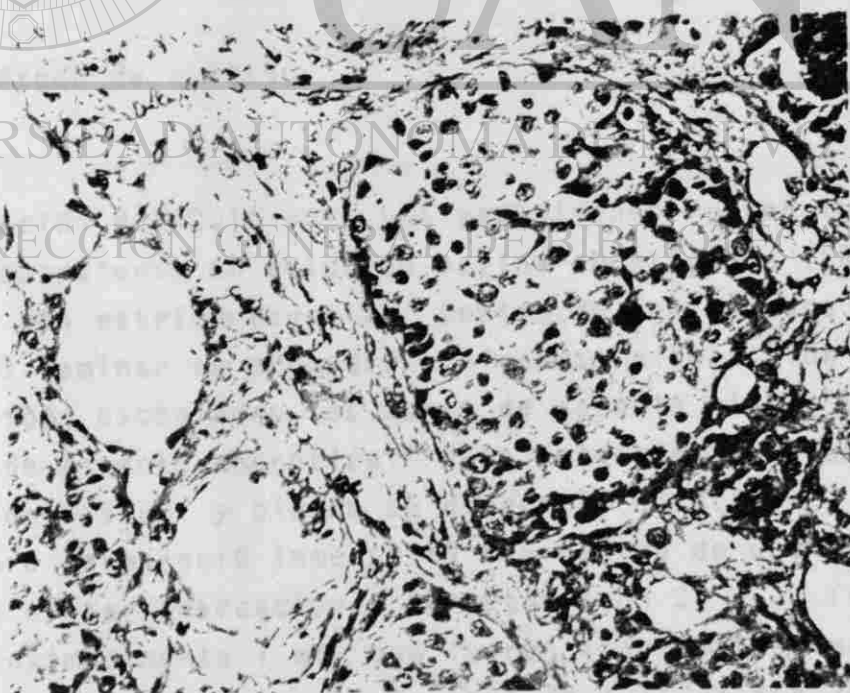


Figura No. 12. Sección histológica de adenocarcinoma mamario; obsérvese el tejido conjuntivo que rodea un is lote de células malignas. H y E, 40X

b) Material no biológico.

Como medio de cultivo se utilizó medio RPMI-1640 en solución salina de Earle, suplementado con 10% de suero fetal de ternera, 1% de glutamina, así como 10^5 unidades de penicilina y 10^5 microgramos de estreptomina por litro. El pH final del medio fué de 7.3 y se calentó a 37°C antes de su uso.

Se preparó solución salina con amortiguador fosfato (PBS) por el método descrito por Kruse (16) y se esterilizó en autoclave. Se preparó tripsina (Difco 1;250) en forma de solución al 0.25% en PBS (26) y se esterilizó por filtración con micropore de 0.45 micras.

Se utilizaron frascos de poliestireno T-25 de Corning para siembra y subcultivo.

c) Método de cultivo.

Iniciación del Cultivo: Los especímenes fueron transportados al laboratorio en solución salina amortiguada (PBS) y trabajados con estricta asepsia. Dentro de una campana de flujo vertical laminar se procedió a efectuar disociación mecánica del tejido, escogiendo las zonas de aspecto viable y retirando las de aspecto necrótico. Para éste efecto se utilizaron hojas de bisturí y pinzas de disección estériles. El tejido siempre permaneció inmerso en PBS dentro de una caja de Petri para evitar desecación. Se obtuvieron 20 a 30 fragmentos de aproximadamente 1 mm^3 que fueron transferidos mediante el uso de pipeta Pasteur, a 3 frascos de cultivo con 25 cm^2 de superficie de cultivo.

Una vez colocados los explantes en los frascos, se les adicionaron 2 ml. de suero fetal de ternera, 200 unidades de penicilina y 200 microgramos de estreptomina. Los frascos se cerraron y se pasaron a incubación a 37°C con atmósfera húmeda y con 5% de CO₂. Los cultivos no fueron movidos si no hasta el tercer día post-explante. Este procedimiento tuvo como objetivo permitir la adherencia del explante a la superficie de crecimiento. De no ser así, está flota y no prospera el cultivo. Al tercer día se decantó el suero y se reposo con 3 ml. de medio RPMI-1640 suplementado en la forma antes descrita. Al cuarto o quinto día de cultivo se observaron los primeros fibroblastos saliendo del explante; en un principio fueron pocos, pequeños y se encontraron muy cerca del explante. Con el tiempo adquirieron mayor tamaño y movilidad, llegando a emigrar a partes lejanas al explante. El aumento de las exigencias metabólicas hizo necesario cambiar el medio de cultivo con frecuencia (aproximadamente cada cuarto día) siendo la producción de ácido un indicador útil para juzgar la necesidad de cambio. Esto fué visible por el viraje del rojo fenol a color amarillo al bajar el pH.

Paulatinamente los espacios entre una célula y otra fueron ocupados por nuevas células hasta que al final de la tercera semana, se estableció una monocapa confluyente y apareció la inhibición de la reproducción celular sucitada por el contacto entre las membranas citoplásmicas de una y otra célula. En ese momento el cultivo se encontró en condición de ser subcultivado y de pasar así a la fase II de Hayflick.

Subcultivo de Monocapas Confluentes: Tan pronto como confluyó la monocapa, se procedió a retirar el medio agotado y lavar el cultivo repetidamente con PBS libre de iones de calcio y magnesio. Puesto que éstos iones son indispensables para la agregación de unas células con otras, éstos debieron retirarse para permitir una mejor dispersión de las células constitutivas de la monocapa. Esta dispersión facilitó la

cuantificación celular así como una resiembra más uniforme. La disociación de la monocapa se obtuvo mediante el uso de enzimas proteolíticas; se prefirió el uso de tripsina al 0.25% en solución salina con amortiguador de fosfato (PBS). Esta solución tripsina-PBS previamente calentada a 37°C, se agregó a razón de 2 ml. por cada frasco T-25, se pasó a la incubadora y se permitió actuar por 4 a 10 minutos. El tiempo de incubación dependió de la actividad biológica de la solución enzimática, (entre más envejecida la solución se requirió más tiempo de exposición), y del tiempo que tuviera de confluída la monocapa (entre más tiempo tuviese de confluída la monocapa, más tiempo fué necesario para que la tripsina disociara a las células).

Una observación cuidadosa y el uso de pequeños golpes al frasco de cultivo revelaron el momento de desprendimiento y disociación de la monocapa. Una agitación vigorosa completó la disociación e inmediatamente se adicionaron unas gotas de suero fetal de ternera para inactivar la tripsina. Las células se centrifugaron, se lavaron con PBS libre de calcio y de magnesio y se determinó el porcentaje de viabilidad. Para conocer el porcentaje de células vivas se utilizó la prueba de exclusión de azul de tripano (16,26,34). En las series trabajadas (C-82-21 y C-82-23) el porcentaje de células viables era de $97 \pm 2\%$. Posteriormente las células se resuspendieron en medio fresco y se sembraron en forma reduccional, o sea que de cada frasco original se obtuvieron dos frascos de resiembra. Al efectuarse este primer pasaje, el tejido pasó a la fase de crecimiento logarítmico. La observación de los cultivos en esta fase reveló gran cantidad de células de forma esferoidea. Estas formas correspondieron a la contracción pre-mitótica que sufren los fibroblastos. Las células en fase esferoide se adherieron muy laxamente a la superficie de crecimiento y se desprendieron con facilidad. Estas células se desplazaron con movimientos pasivos del líquido nutritivo

y se establecieron en sitios lejanos al de su origen.

Como el cultivo primario pasó a constituirse en cepa celular, se abrió la posibilidad de alteración en el número modal de cromosomas. Se procedió entonces a la cariotipificación celular.

d) Método de carioanálisis.

Para determinar si los cultivos seguían siendo diploides o si habían sufrido alteración cromosómica, se procedió a efectuar carioanálisis con el método de Moorhead para fibroblastos (16) modificado en nuestro laboratorio. La modificación al método consistió en un alargamiento del tiempo de exposición a solución hipotónica. El método fue el siguiente:

Primero: Al medio de cultivo se agregó colchicina a una concentración final de 0.4 microgramos por ml. y se incubó a 37°C por 3 horas; esto produjo detención de las mitosis en metafase.

Segundo: Se retiró el medio de cultivo, se lavó en PBS libre de calcio y magnesio y se cosechó con tripsina. La suspensión se centrifugó a 200g por 5 min para formar botón.

Tercero: Después de aspirar el sobrenadante, se resuspendieron las células con 5 ml. de solución hipotónica de KCl (0.075 M), dejándose hinchar por 14 a 18 minutos. Se agregó una gota de fijador frío (metanol absoluto y ácido acético glacial 3:1 v/v). Se resuspendió y centrifugó nuevamente.

Cuarto: Se retiró el sobrenadante, se agregaron 5 ml. de fijador fresco y se fijó por 30 minutos.

- Quinto: Se resuspendió y centrifugó con cantidades cada vez menores de fijador hasta obtener una suspensión densa.
- Sexto: Se dejaron caer 2 a 3 gotas de la suspensión de una altura de 50 cm., sobre un porta-objetos previamente limpiado con metanol frío. Se flameó rápidamente para remover el exceso de fijador.
- Septimo: Se dejó secar en lugar libre de polvo, se tiñó con Giemsa, se secó y se observó a inmersión.

e) Método de radiación y cuantificación.

Se seleccionaron 6 frascos de cultivo de cada serie, cuya monocapa fuese confluyente y se procedió a pasarlos a una fase de meseta no alimentada como propuesto por Deschavanne (4). Esto trajo como consecuencia una reducción al máximo de la actividad mitótica del cultivo. Los experimentos de Robertson y Nagasawa han demostrado que en esta fase de cultivo, 90% de las células se encuentran en la fase G_1 del ciclo celular (determinado por análisis microfluorimétrico) y solo un 0.5-2.0% se encuentran en fase S del ciclo celular (demostrable por incorporación de 3H-timidina). (19,20).

Los cultivos de la serie C-82-23 (pulmón normal) se encontraron en el séptimo pasaje y los cultivos de la serie C-82-21 (adenocarcinoma mamario) se encontraban en su octavo pasaje, aceptándose entonces que éstos presentaban relativamente la misma edad en cultivo.

Como fuente de radiación gamma se utilizó aparato Tera-tron 80 de la "Canadian Atomic Energy Commission", con isótopo de cobalto 60. Se administraron dosis de 0 a 250 rads en múltiplos

tiplos de 50 rads a los diferentes frascos de cultivo. La rapidez de administración de la dosis fue de 84 rads por minuto. Cada serie se corrió con su propio control. La radiación se efectuó a temperatura ambiente. Se ajustó el nivel de líquido de cultivo para que existiese una capa de 0.5 cm. de grosor sobre la monocapa celular. Esto permitió el máximo efecto de la radiación gamma sobre el cultivo. La radiación se administró como dosis única sobre un campo de 10×10 cm., con una homogeneidad de dosis de aproximadamente $98 \pm 2\%$. De esta manera:

El frasco No. 1	recibió	0 rads	(control)
El frasco No. 2	recibió	50 rads	
El frasco No. 3	recibió	100 rads	
El frasco No. 4	recibió	150 rads	
El frasco No. 5	recibió	200 rads	y
El frasco No. 6	recibió	250 rads.	

Inmediatamente después de terminar la radiación, los cultivos se pasaron a incubación a 37°C , en atmósfera húmeda, $5\% \text{CO}_2$ por 18 horas para permitir la reparación de daño subletal (2,4,7,19). El medio de cultivo no fué cambiado para aprovechar los factores de regeneración presentes en el mismo (17).

Al completarse el período de 18 horas, los cultivos se cosecharon en la forma descrita y se cuantificó el número de células presentes en el sobrenadante mediante el uso de la cámara de Neubauer. Se procedió a efectuar una resiembra reduccional con un número conocido de células para cada frasco irradiado así como del control. Se adicionó medio fresco al medio irradiado y se permitió incubar por 15 días con un cambio de medio al séptimo día. Al completarse las 2 semanas de cultivo post-irradiación, se cosecharon nuevamente las monocapas y se cuantificó el número total de células en los dos frascos de subcultivo obtenidos de cada frasco original que

recibió radiación. Esta cifra se comparó con la cifra obtenida en la primera cosecha post-irradiación (a las 18 horas) y se estableció una diferencia llamada "valor de sobrevida", (SV). De esta manera:

$$\text{Sobrevida} = \frac{\text{recuento celular a los 15 días post-irradiación}}{\text{recuento celular a las 18 horas post-irradiación}}$$

$$SV = \frac{RC_2}{RC_1}$$

Posterior a su cuantificación, las células se descartaron y se prepararon nuevos cultivos en meseta no alimentada para irradiación. Estos experimentos se repiten en segunda y tercera ocasión. En total, de cada tejido explantado, se obtuvieron 18 monocapas para irradiación, divididas en 3 tandas de 6 frascos. Puesto que fueron dos diferentes tejidos explantados, el total de frascos sometidos a radiación gamma fué de 36.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

	Serie A, Frascos 1-6	0-250 rads
Pulmón normal C-82-23	Serie B, Frascos 1-6	0-250 rads
	Serie C, Frascos 1-6	0-250 rads
Adenocarcinoma C-82-21	Serie A, Frascos 1-6	0-250 rads
	Serie B, Frascos 1-6	0-250 rads
	Serie C, Frascos 1-6	0-250 rads

III. RESULTADOS.

a) Resultados preliminares.

Características de las células en cultivo: El cultivo C-82-23 (pulmón normal) rindió células de tipo fibroblástico únicamente. El cultivo C-82-21 (adenocarcinoma mamario) en el período primario rindió escasas células tumorales de muy baja viabilidad. Estas células nunca se adherieron a la superficie de cultivo ni propagaron. Pronto mostraron características degenerativas y fueron desapareciendo rápidamente. La segunda población celular que rindió el tumor mamario fué fibroblástico. Esta población sí fué vigorosa en su crecimiento y presentó características morfológicas y cinéticas indistinguibles de aquellos fibroblastos obtenidos del cultivo de pulmón normal.



Figura No. 13. Células primarias de adenocarcinoma mamario.- Obsérvese la forma redondeada y el aspecto granuloso del citoplasma. Tejido vivo, 10X

Ambas cepas celulares, C-82-23 (pulmón normal) y C-82-21 (carcinoma mamario) desarrollaron células alargadas de aproximadamente 180×15 micras. Cuando aún existía bastante espacio entre célula y célula, se observó que éstas adoptaron una forma abanicada con una prolongación fina, extraordinariamente larga, misma que podía entrar en contacto con otras células. Cuando el crecimiento fue más denso, las células se volvieron fusiformes y adoptaron orientación en dirección común y frecuentemente aparecieron patrones de crecimiento arremolinados. Las células presentaron un solo núcleo, que podía ser redondeado, ovalado o elongado, de acuerdo a la forma que adoptó la célula según la densidad de población. El núcleo contenía 1 a 4 nucléolos que podían ser ovalados o de aspecto ramificado. Estas células eran muy transparentes, con citoplasma finamente granuloso; para su observación se prefirió microscopía con contraste de fase.



Figura No. 14. Células primarias del tejido conjuntivo que muestran forma típicamente fibroblástica. Tejido fijado, H y E, 10X



Figura No. 15. Fibroblastos "abanicados" de población poco densa. Obsérvense las prolongaciones finas y la ramificación nucleolar. Fijado, HyE, 40X

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

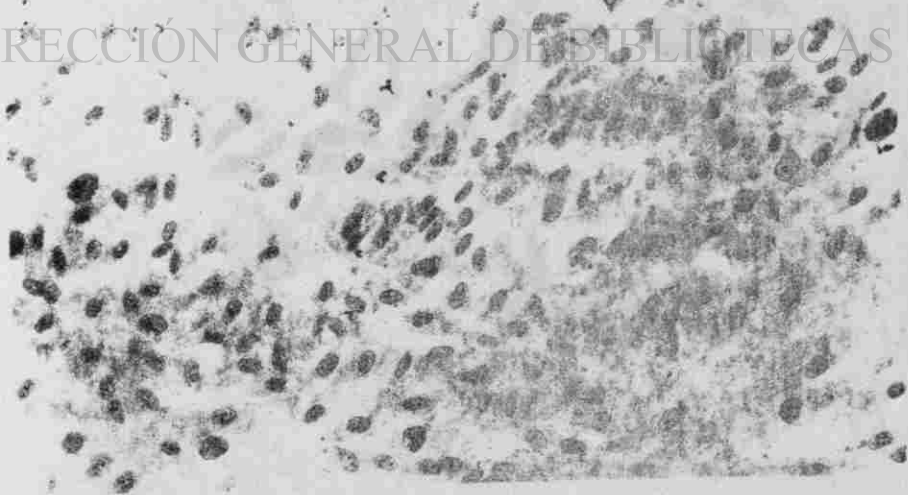
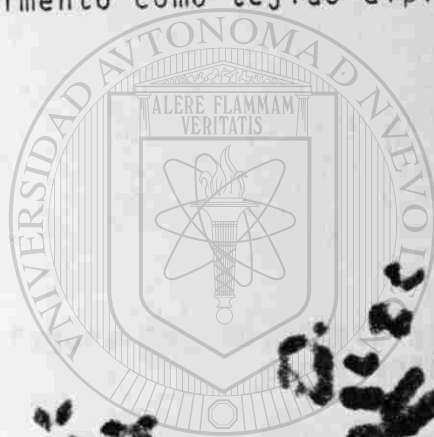


Figura No. 16. Fibroblastos fusiformes de población densa. Tejido fijado, H y E, 10X

Características cromosómicas: El análisis cromosómico de la cepa C-82-23 (pulmón normal) mostró un complemento cromosómico de 46 XY. Se concluyó que no había alteración cromosómica, que el tejido era diploide y adecuado para el experimento.

El análisis cromosómico de la cepa C-82-21 (adenocarcinoma mamario) mostró un complemento cromosómico de 46 XX. También se juzgó libre de alteración y adecuado para el experimento como tejido diploide.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECA

®

Figura No. 17. Metafase de fibroblasto de origen pulmonar. C-82-23 Giemsa, 100X

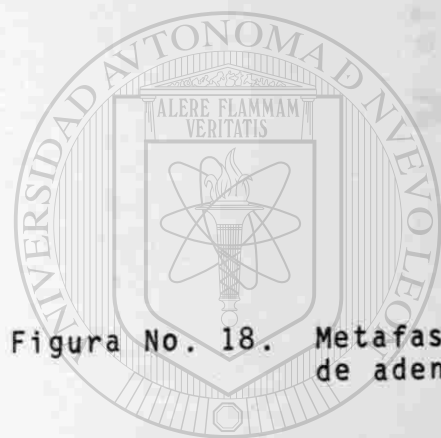


Figura No. 18. Metafase de fibroblasto derivado del cultivo de adenocarcinoma mamario. Giemsa, 100X

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los cariotipos armados que se muestran a continuación, no muestran alteración.

CARIOTIPO No. C-82-23

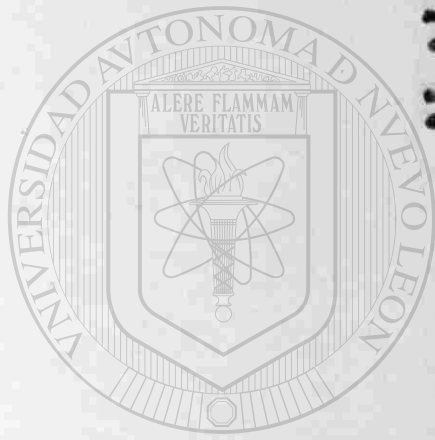
NOMBRE. JORGE AGUIRRE

EDAD. 14 años SEXO. MASCULINO

FECHA. 27 de Abril de 1982

FORMULA CROMOSOMICA. 46XY

PRACTICO.D.G.S. - M.R.



CROMOSOMAS SEXUALES

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

SECCION DE GENETICA HUMANA

FACULTAD DE MEDICINA, U.A.M.L.

CARIOTIPO No. C-82-21 Ca. de Mama

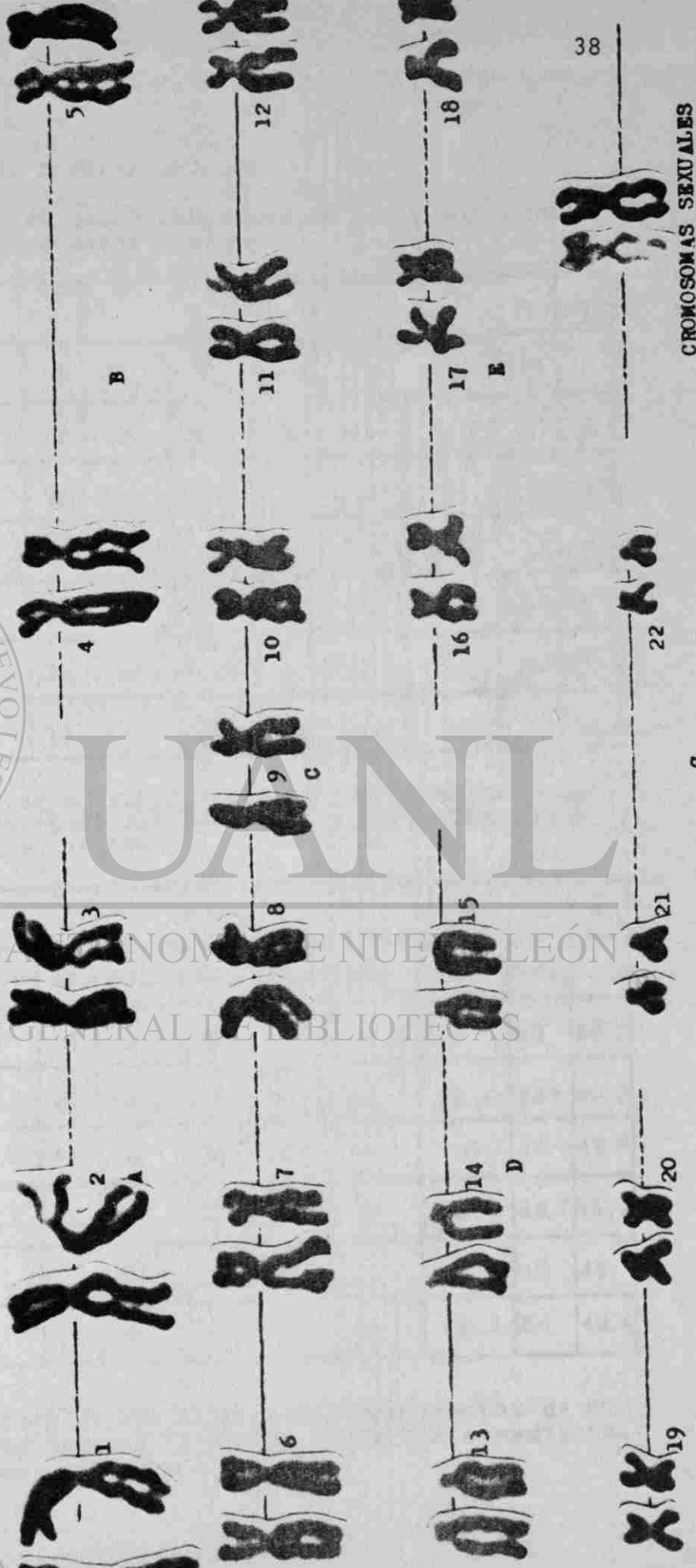
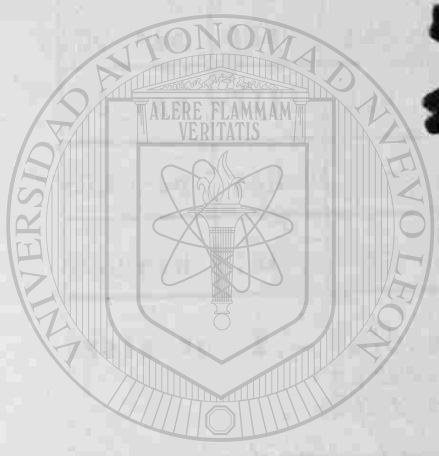
NOMBRE. Josefina Nieto Nájera

EDAD. 70 Años SEXO. Femenino

FECHA. 20 de Abril de 1982

FORMULA CROMOSOMICA. 46, XX.

PRACTICO. D.G.S.; M.E.R.C.; G.A.F.B.



b) Resultados de la experimentación

El computo de datos obtenidos en los experimentos se resumen en las siguientes tablas:

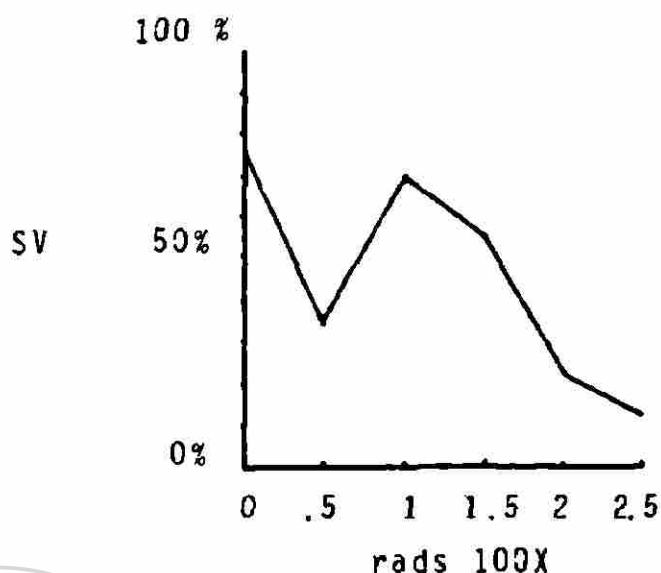
	A			B			C			\bar{X}
	RC ₁	RC ₂	SV%	RC ₁	RC ₂	SV%	RC ₁	RC ₂	SV%	
Control	301	221	73	330	314	95	266	162	61	76.3
50 rad	372	140	37	481	168	34	352	150	42	37.6
100 rad	164	145	88	122	99	81	372	153	41	70
150 rad	371	202	54	364	140	62	462	238	51	55.7
200 rad	240	60	25	89	20	23	113	22	20	22.6
250 rad	136	17	12	552	111	20	466	37	7	13.4

Tabla No. 2.- Valores de sobrevida para fibroblastos pulmonares (C-82-23) expuestos a radiación gamma. Factor: 5,000.

	A			B			C			\bar{X}
	RC ₁	RC ₂	SV%	RC ₁	RC ₂	SV%	RC ₁	RC ₂	SV%	
Control	42.5	11	26	53	38.5	73	62.8	50	80	59.6
50 rad	65.5	19	29	98.5	11.5	11.6	33	35.5	107	49.2
100 rad	61.5	26.5	43	70	10	13	20	18	30	48.6
150 rad	82	28.5	34.7	45	3.75	8.3	44	28.5	64.7	35.9
200 rad	109	34	31.1	87	12.2	14	35	31.5	90	45
250 rad	104.5	18	17	36	7	19.4	50	42.5	85	40.4

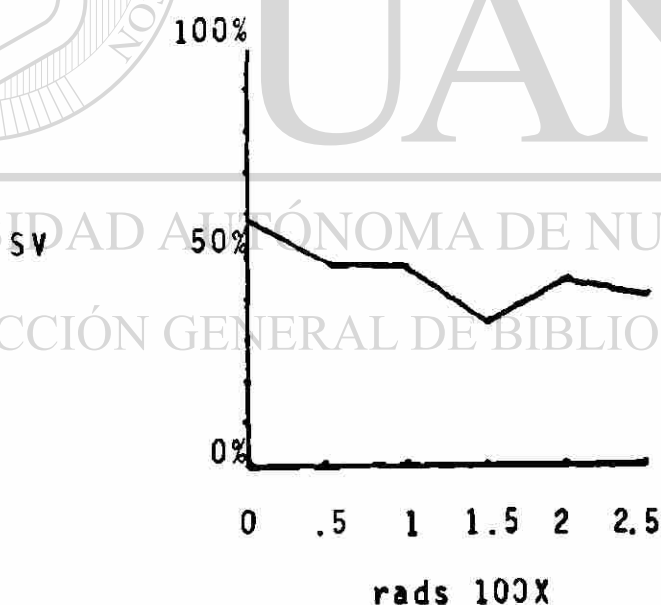
Tabla No. 3.- Valores de sobrevida para fibroblastos de estroma tumoral (C-82-21) expuestos a radiación gamma. Factor: 5,000.

La graficación de éstos resultados muestra las siguientes curvas:



Gráfica No. 2. Porcentaje de sobrevida de fibroblastos pulmonares expuestos a radiación gamma.

La curva muestra una pendiente "brusca" con una muesca en el valor de sobrevida tomado a los 50 rads.

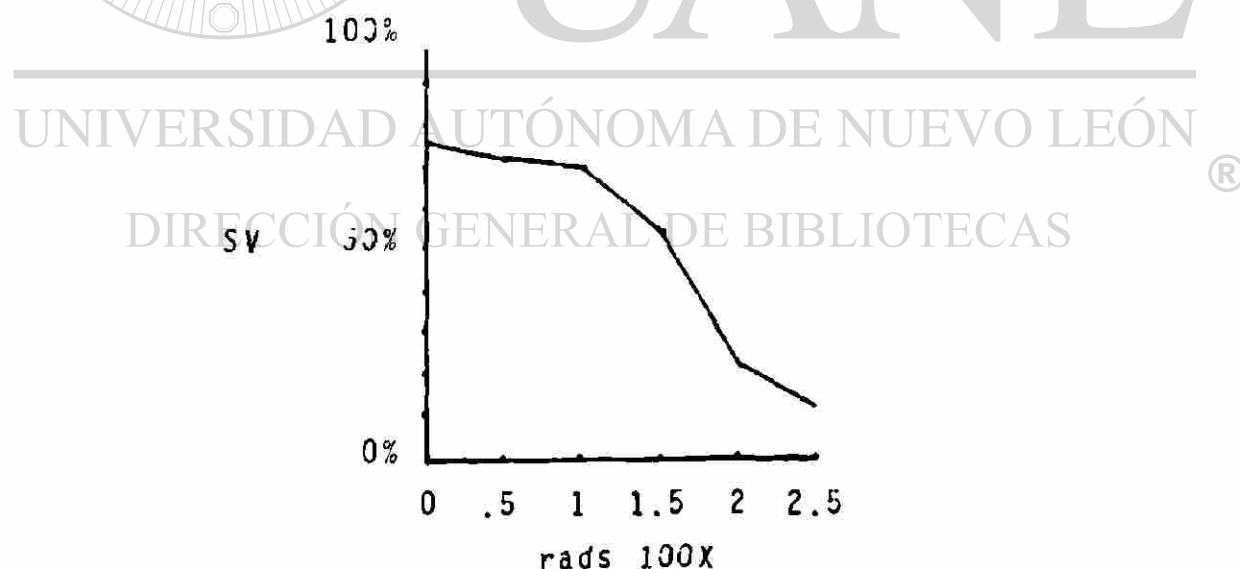


Gráfica No. 3. Porcentaje de sobrevida de fibroblastos de estroma tumoral expuestos a radiación gamma.

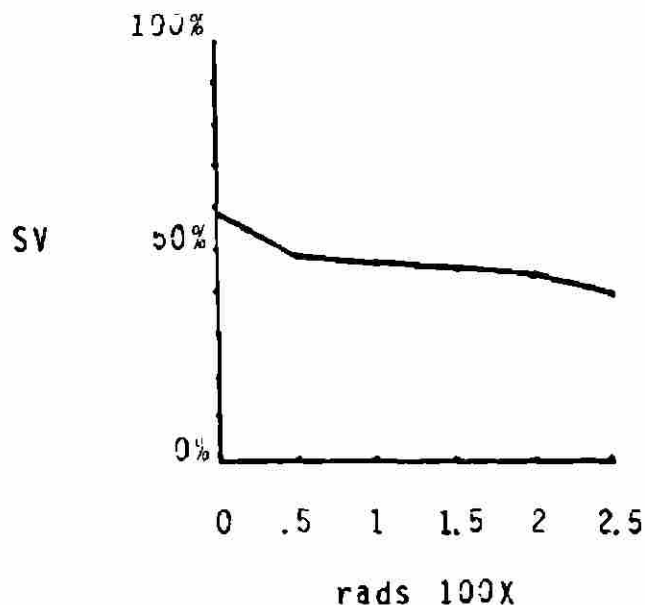
La curva muestra una pendiente "suave" con una pequeña muesca en el valor de sobrevida tomado a los 150 rads.

En ambas curvas aparece un valor que se aleja de la tendencia de la curva. Estas desviaciones de los valores se deben a problemas técnicos que consisten en desprendimiento celular incompleto de los frascos de crecimiento. Puesto que esto es necesario para llevar a cabo la cuantificación celular, la falta de desprendimiento lleva a valores equivocadamente bajos. Debido a que existe error técnico en éstos cálculos, se procede a suprimir el valor obtenido en el laboratorio y en su lugar colocar un valor obtenido por cálculo mediante el uso de regresión lineal, (método de cuadrados mínimos), basándose en el comportamiento matemático de la curva.

De esa manera, la discriminación de datos poco confiables produce curvas más factibles, mismas que se grafican de las siguientes formas:

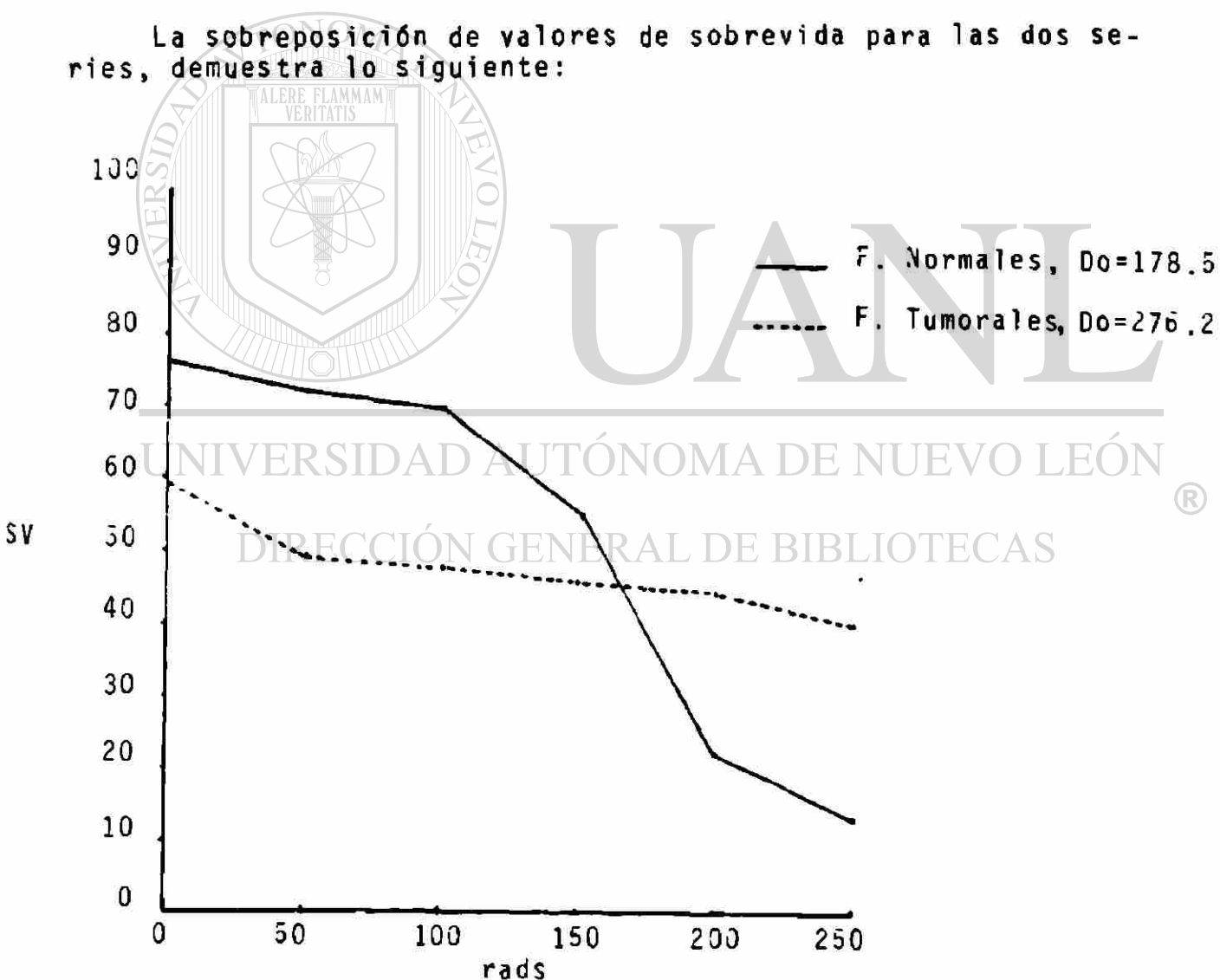


Gráfica No. 4. Porcentaje de supervivencia de fibroblastos pulmonares expuestos a radiación gamma. Valor corregido para 50 rads. (Regresión lineal, método de cuadrados mínimos).



Gráfica No. 5. Porcentaje de supervivencia de fibroblastos de estroma tumoral expuestos a radiación gamma. Valor corregido para 150 rads. (Regresión lineal, método de cuadrados mínimos).

La sobreposición de valores de supervivencia para las dos series, demuestra lo siguiente:



Gráfica No. 6. Comparación de comportamiento de curvas de supervivencia para fibroblastos pulmonares y de estroma tumoral, expuestos a radiación gamma. Valores corregidos.

El descenso brusco de la curva de fibroblastos normales lleva a la intersección con la curva de descenso gradual del grupo tumoral. El punto de intersección corresponde a aproximadamente 170 rads.

Se calcularon las dosis letales medias (D_0) para la región exponencial de la curva, encontrándose que para los fibroblastos pulmonares, la D_0 fué de 178.5 rads y que para los fibroblastos de estroma tumoral, la D_0 fué de 276.2 rads.

IV. DISCUSION.

Es evidente que las curvas de sobrevivida para ámbas series de fibroblastos son diferentes. El comportamiento del fibroblasto normal en cultivo frente a la radiación gamma, es uno de alta radiosensibilidad, con un "hombro" en la porción inicial de la curva (dosis bajas) seguido por un descenso de tipo exponencial (dosis altas). Esto es congruente con las curvas de sobrevivida publicadas por Guichiard (10) y Paterson (25).

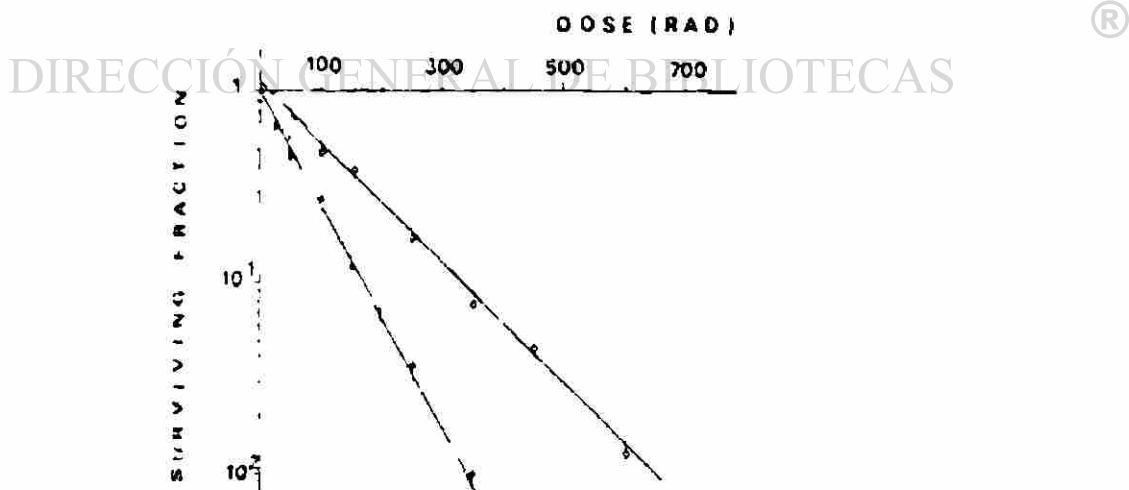
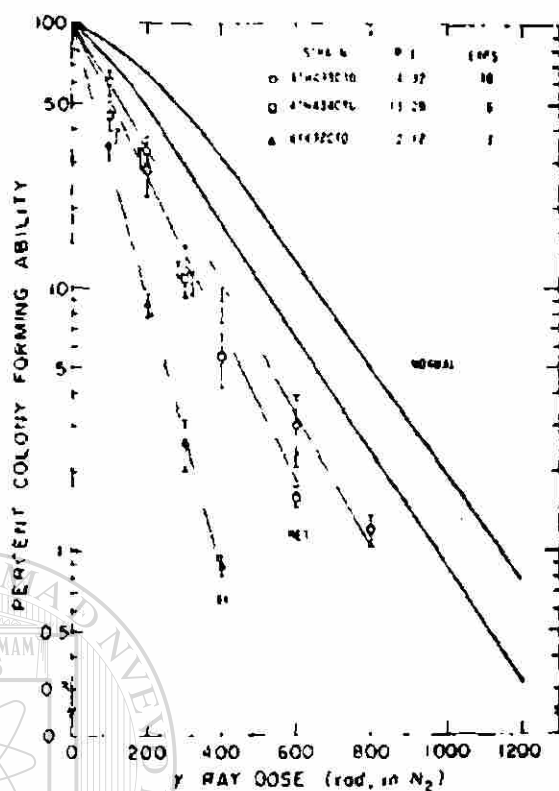


Fig 3. Survival curves of HF 19 fibroblasts irradiated with ⁶⁰Co γ rays. ●, 50 MeV neutrons

Gráfica No. 7. Porcentaje de sobrevivida de fibroblastos normales irradiados con Cobalto. Guichiard, et.aT.



Gráfica No. 8. Curva de sobrevivencia para fibroblastos normales irradiados con Cobalto. Paterson, et. al.

A diferencia de las series normales, los fibroblastos de estroma tumoral no mostraron un hombro en la región inicial de la curva y el descenso en sobrevivencia fue más gradual, demostrándose más radioresistencia que en el grupo normal.

La irradiación en el presente estudio tuvo un rango de 0-250 rads, en comparación a los dos estudios anteriores de Guichard y Paterson, que tuvieron rangos mayores: 0-700 rads y 0-1,200 rads respectivamente. En esta experiencia se estudia el comportamiento de fibroblastos a dosis relativamente bajas, o sea la región del hombro de la curva, así como la porción inicial de declinación exponencial.

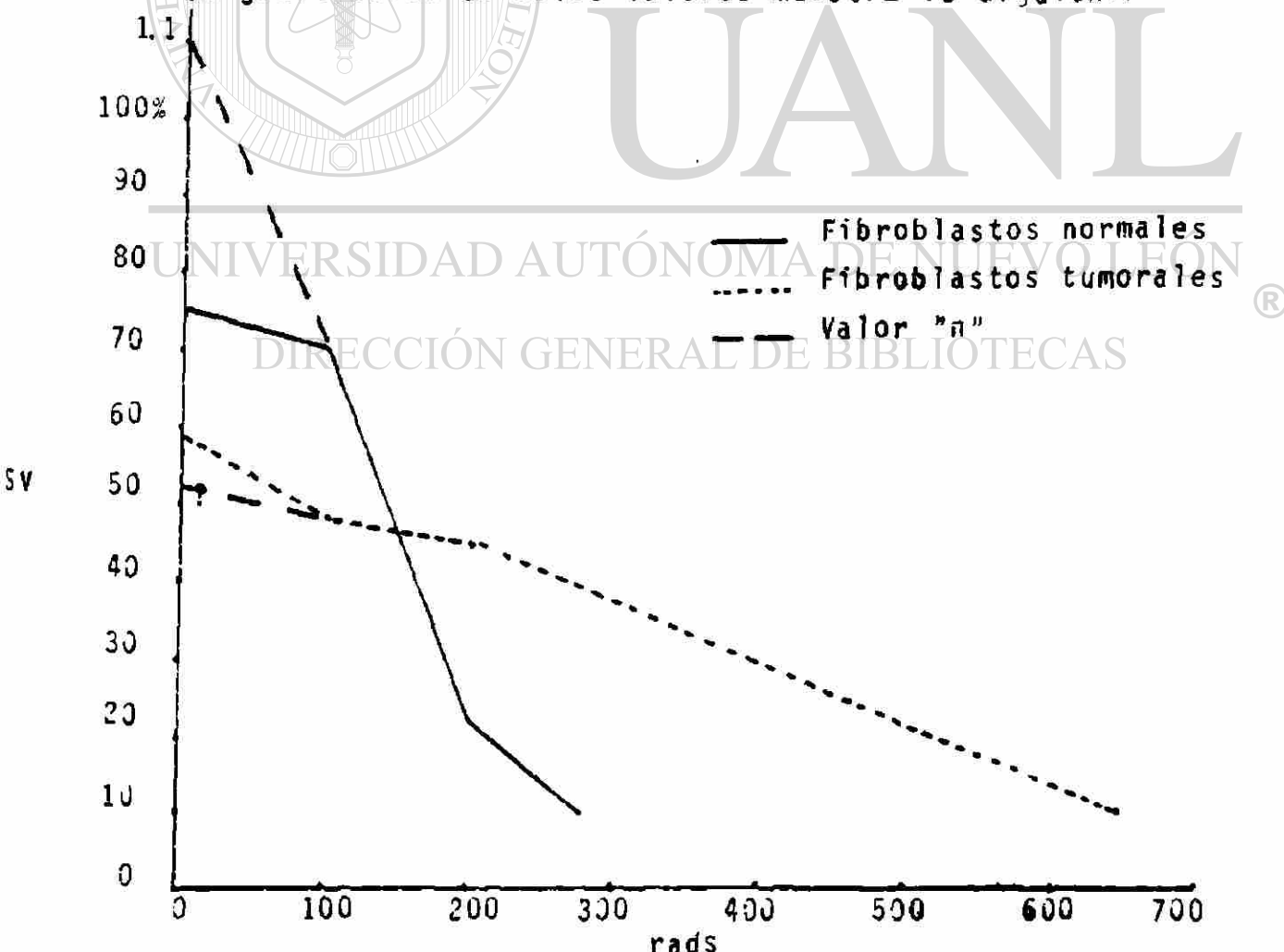
En el estudio de las curvas de sobrevivencia, los tres parámetros útiles en la descripción de la curva son: el valor "n", que corresponde al número en la ordenada (expresado como fracción de sobrevivencia) obtenida por extrapolación de la región ex

ponencial de la curva a la dosis cero; el valor " D_0 ", que corresponde a la dosis necesaria para reducir la sobrevida a 37% en la región exponencial de la curva y el valor " D_{10} ", que corresponde a la dosis necesaria para reducir la sobrevida a un 10% (25). Estos valores se comparan en la siguiente tabla:

	n	D_0	D_{10}
Normales	1.12	178.5	277.1
Tumorales	No Comp.	276.2	639.1

Tabla No. 4. Parámetros habituales útiles en el estudio de curvas de sobrevida (n , D_0 , D_{10}) y los valores correspondientes para los fibroblastos en estudio. (Regresión lineal, método de cuadrados mín.)

La graficación de éstos valores muestra lo siguiente:



Gráfica No. 9. Valores " n ", D_0 y D_{10} para fibroblastos normales y de estroma tumoral, obtenidos por regresión lineal, método de cuadrados mínimos.

Esta gráfica permite observar que los fibroblastos normales, cuyo D_{50} es de 178.5 rads, son más radiosensibles que los fibroblastos de estroma tumoral, cuyo D_{50} es de 276.2 rads. Estos datos fueron sometidos a análisis estadístico, utilizando como herramienta, el análisis de varianza (bloques azarizados).

El estudio reveló que debido a la dispersión de valores experimentales, es necesario aumentar el rango de rads, (hasta producir el abatimiento completo de ambas curvas), para demostrar una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de sobrevivencia de uno y otro grupo de fibroblastos.

Este hallazgo no invalida el concepto de mayor radiosensibilidad en fibroblastos normales que en fibroblastos de estroma tumoral, sugerida por el trazado de las curvas, sino que hace patente la necesidad de efectuar un mayor número de experimentos y de perfeccionar las técnicas de disociación y recuento celular, para poder así disminuir la dispersión de los datos y de ésta manera aumentar la confiabilidad de los resultados (22).

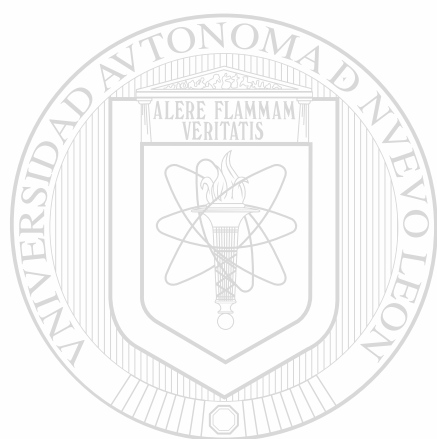
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

V. CONCLUSIONES.

1o.- Debido al aspecto de las curvas de sobrevivencia, existe posibilidad que los fibroblastos normales y los fibroblastos de estroma tumoral no se comporten en forma igual frente a la irradiación gamma, dentro del rango de dosis utilizado en el experimento.

2o.- La diferencia de comportamiento entre las dos series pudiera consistir en una mayor radioresistencia de los fibroblastos de origen tumoral.

30. Es evidente que existe necesidad de mayor experimentación para poder obtener resultados conclusivos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VI. BIBLIOGRAFIA.

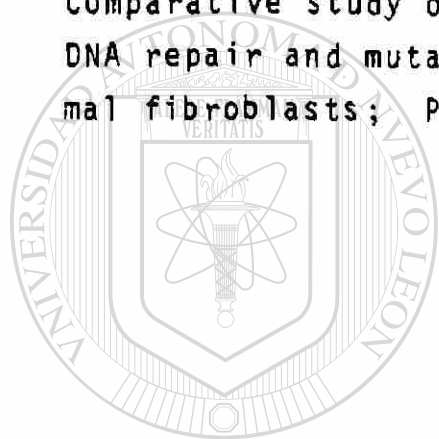
- 1.- Casarett, G.W.: Radiation injury; Surg. Ann. 4:103, _
1972.
 - 2.- Cox, R., Masson, W.K.: Changes in radiosensitivity du-
ring the in vitro growth of diploid human fibroblasts;_
Int. J. Radiat. Biol., Vol. 26, No. 2, 193-196, 1974.
 - 3.- Cox R., Thacker, J., Goodhead, D.T.: Inactivation and_
mutation of cultured mammalian cells by aluminum charac-
teristic ultrasoft X-rays; Int. J. Radiat. Biol., Vol. _
31, No. 6, 561-576, 1977.
 - 4.- Deschavanne, P., Fertil, B., Malaise, E., Lachet, B.: _
Radiosensitivity and repair of radiation damage in hu-
man HF19 fibroblasts; Int. J. Radiat. Biol., vol. 38, _
No. 2, 167-177, 1980.
-
- 5.- Finch, S.C.: The study of atomic bomb survivors; Am. _
J. Med., 66:899, 1979
 - 6.- Finch, S.C.: The study of atomic survivors in Japan; _
Mass. J. Med.; 66:899, 1979.
 - 7.- Ghidoni, J.J.: Light and electron microspopic study of
primary liver 36-38 hours after high doses of 32 milli-
on electronvolt protons; Lab. Invest., 16:268, 1967.
 - 8.- Gilchrest, B.: Prior chronic sun exposure decreases the
lifespan of human skin fibroblasts in vitro; Journal of
Gerontology, Vol. 35, No. 4, 537-541, 1980.

- 9.- Gilchrest, B: Relationship between actinic damage and chronological aging in keratinocyte cultures of human skin; *The Journal of Investigative Dermatology*, 72:219-223, 1979.
- 10.- Guichard, M., Gueulette, J., et. al.: The comparative response of human fibroblast EMT6 and V79 cells to 50 MeV neutrons; *J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol.4, 1978.
- 11.- Hayflick, L.: The limited in vitro lifetime of human Diploid cell strains; *Experimental Cell Research*, 37, 614-636, 1965.
- 12.- Hayflick, L., Moorhead, P.S.: The serial cultivation of human cell strains; *Experimental Cell Research*, 25, 585-621, 1961.
- 13.- Hutchinson, F.: The molecular basis for radiation effects on cells; *Cancer Res.*, 26:2045, 1966.
- 14.- Johns, H.E., Cunningham, J.R.: *The Physics of Radiology*, 3rd. Ed., Springfield, Illinois, Charles C. Thomas, p. 3, 1969.
- 15.- Krepensky, A., Rainbow, A., Heddle, J.: Studies on the ultraviolet light sensitivity of Bloom's syndrome fibroblasts, *Mutation Research*, 69, 357-368, 1980.
- 16.- Kruse, P., Patterson, M.: *Tissue Culture, Methods and Applications*; Academic Press, New York, 1973.
- 17.- Little, J.B.: Repair of potentially-lethal radiation damage in mammalian cells; enhancement by conditioned medium from stationary cultures; *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 20, No. 1, 87-92, 1971.

- 18.- Maceira-Coelho, A., Diatloff, C., et. al.: Effect of low dose rate irradiation on the division potential of cells in vitro; *J. Cell Physiol.*, 95: 235-233, 1978.
- 19.- Malcolm, A., Little, J.B.: Rapid recovery in human diploid fibroblasts; *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 38, No. 4, 439-447, 1980.
- 20.- Malcolm, A., Little, J.B.: Rapid recovery in plateau-phase mammalian cells; *Radiation Research*, 80, 38-48, 1979.
- 21.- Martin, G., Curtis, A., Sprauge, B.S.: Replicative life-span of cultured human cells; effects of donor's age, tissue and genotype; *Laboratory Investigation*, Vol. 23, No. 1, 86-92, 1970.
- 22.- Mora, H.: Comunicación personal; Sección de Bioestadística, Dept. de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Mayo, 1983.
- 23.- Morgan, C.: Hiroshima, Nagasaki and the Radiation Effects Research Foundation; *Am. J. Pathol.*, 98:843, 1980.
- 24.- Okita, T.: Review of 30 years of study of Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivors, II. Biological Effects; *J. Radiat. Res. (Suppl.)*, 16:49, 1975.
- 25.- Patterson, M., Anderson, A., Smith, B.: Enhanced radiosensitivity of cultured fibroblasts from ataxia telangiectasia heterozygotes manifested by defective colony forming ability and reduced DNA repair replication after hypoxic gamma irradiation; *Cancer Research*, 39, 3725-3734, Sept., 1979

- 26.- Paul, J.: "Cell and Tissue Culture", 5th Ed., Churchill Livingstone, London, 1975.
- 27.- Prasad, K.N.: Human Radiation Biology; Hagerston, Maryland; Harper and Row, p. 58, 1974.
- 28.- Raaphorst, G.P., Kruuv, J.: The radiation response of cultured mammalian V79-S171 cells exposed to a wide range of sulfate salt solutions; Int. J. Radiat. Biol., Vol. 33, No. 2, 173-183, 1978.
- 29.- Robbins, S., Angel, M., Kumar, V.: Basic Pathology; 3rd. Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1981.
- 30.- de Robertis, E.D., de Robertis, E.M.: Cell and Molecular Biology; 7th Ed., Saunders College, Philadelphia, p. 364-370, 1980.
- 31.- Rubin, R., Casarett, G.W.: Clinical Radiation Pathology; W.B. Saunders Co., Philadelphia, p. 903, 1968.
- 32.- Rudiger, H.W.: Methods to culture diploid fibroblasts on a large scale; in Methods in Cell Biology; David M. Prescott, Ed., Academic Press, New York, 1975.
- 33.- Russel, W.L., et. al.: Radiation dose rate and mutation frequency; Science, 128:1546, 1958.
- 34.- Taylor, W., Evans, V.: Preparation and use of replicate mammalian cell cultures; in Methods in Cell Biology; David M. Prescott, Ed., Academic Press, New York, 1975.
- 35.- Waldren, C., Rasko, I.: Caffeine enhancement of X-ray killing in cultured human and rodent cells; Radiation Research, 73, 95-110, 1978.

- 36.- Warren, S.: The pathology of ionizing radiation; in
Bioastronautics Data Book, 2nd. Ed., Washington, D.C.,
NASA, 1973.
- 37.- Weichselbaum, R., Nove, J., Little, J.B.: X-ray sensi-
tivity of diploid fibroblasts from patients with heredi-
tary or sporadic retinoblastoma; Proc. Natl. Acad. Sci.,
U.S.A., Vol. 75, No. 8, 1978.
- 38.- Yotti, L.P., Glover, T.W., Trosko, J.E., Segal, D.J.:
Comparative study of X-ray and UV induced cytotoxicity,
DNA repair and mutagenesis in Down's syndrome and nor-
mal fibroblasts; *Pediat. Res.*, 14: 88-92, 1980.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A G R A D E C I M I E N T O S

El autor desea expresar su profundo agradecimiento a sus asesores:

Dr. Sergio de la Garza, Jefe del Departamento de Patología, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León;

Dr. Abby Maizel, Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Sección de Patología Experimental, M.D. Anderson Hospital and Tumor Research Institute, University of Texas Cancer System;

Dr. Rogelio Salinas, Jefe del Servicio de Radioterapia del Hospital Universitario, "Dr. José Eleuterio González", Universidad Autónoma de Nuevo León;

así como a:

Q.B.P. Martha Robledo Casas, por su asistencia en el cultivo de tejidos;

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dr. Angel Neftalí Cid García, por su asistencia en carioanálisis;

Ing. Heriberto Mora, por su asistencia en estudio estadístico,

además a:

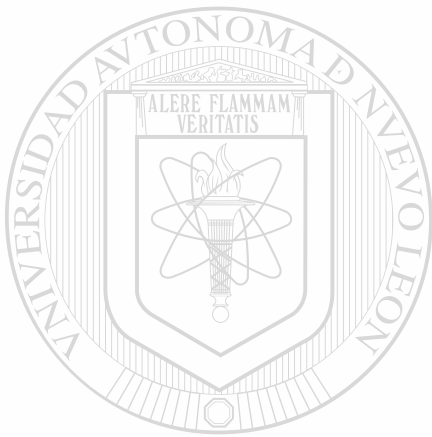
Dr. José Morales Casas, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica de Hospital Universitario, "Dr. José Eleuterio González", Universidad Autónoma de Nuevo León;



Dr. Armando Martínez Millián, Jefe del Departamento de Anatomía Humana del Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad de Monterrey; y

Dr. José Juan Martínez O'Hara, Servicio de Radio-Onco-
logía, Hospital Universitario de la Universidad de Maryland;

por sus ideas, críticas y apoyo.

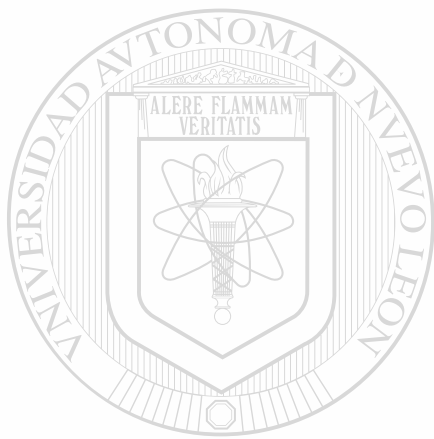


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Este estudio recibió apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través del Fideicomiso para el Apoyo Complementario a la Investigación Científica de la U.A.N.L. [®]

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



BIBLIOTECA

