

**EFFECTO DE LA RADIACIÓN EN CULTIVOS DE LÍNEAS CÉLULARES DE
TUMORES DE SENO Y LARINGE EN EL INSTITUTO NACIONAL DE
CANCEROLOGIA DURANTE EL PERIODO DE MAYO 12 A JUNIO 6 DEL 2003**

INVESTIGADORES

DIANA PATRICIA RAMIREZ PEDOMO. ESTUDIANTE DE MEDICINA
FABIO ANDRES LOZADA DELGADO. ESTUDIANTE DE MEDICINA

ASESORES

Dr GILBERTO ASTAIZA EPIDEMIOLOGO USCO
Dra. CLEMENCIA DE CASTRO. BIOLOGA I.N.C
Dra. TULIA DE MURCIA. BIOLOGA I.N.C
Dr. HECTOR ZAMORA. M.D. NUCLEAR. H.U.N.

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
NEIVA, JUNIO DEL 2003**

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES.....	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. OBJETIVOS.....	19
4.1 GENERAL.....	19
4.2 ESPECIFICO.....	19
5. MARCO TEORICO.....	20
5.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER.....	20
5.1.1 Bases Moleculares del Cáncer.....	20
5.1.2 Cáncer de Seno.....	24
5.1.3 Cáncer de Laringe.....	28
5.2 CULTIVOS CELULARES.....	32
5.2.1 Técnica de Cultivo Celular.....	34
5.3 RADIOTERAPIA.....	37
5.3.1 Radioterapia en Cáncer de Seno.....	47
5.3.2 Radioterapia en Cáncer de Laringe.....	51
6. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES.....	57
7. HIPÓTESIS.....	58
8. DISEÑO METODOLOGICO.....	59
8.1 TIPO DE ESTUDIO.....	59
8.2 POBLACIÓN.....	59
8.3 MUESTRA.....	59
8.3.1 Técnicas e Instrumentos.....	60
8.3.2 Plan de Tabulación.....	64
9. RESULTADOS.....	65

10. DISCUCION DE RESULTADOS.....	72
11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	74
12. BIBLIOGRAFÍA REFERENCIAL.....	75
13. BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	78
ANEXOS.....	82

ÍNDICE DE CUADROS

1. CUADRO 1. Cronograma de Irradiación
de las Líneas Celulares
1170, 1595 y HEP-2.....62

2. CUADRO 2. Numero de Colonias
Mayores de 50 Células de la Línea Celular 1170
Posradiación.....66

3. CUADRO 3. Numero de Colonias Mayores de 50 Células de la
Línea Celular 1595 Posradiación.....67

4. CUADRO 4. Numero de Colonias Mayores de 50 Células de la
Línea Celular HEP-2 Posradiación.....70

ÍNDICE DE GRAFICAS

1. GRAFICA 1. Curva de Mortalidad Posradiación de la
Línea Celular 1170.....67
2. GRAFICA 2. Curva de Mortalidad Posradiación de la
Línea Celular 1595.....69
3. GRAFICA 3. Curva de Mortalidad Posradiación de la
Línea Celular HEP-2.....71

ÍNDICE DE FIGURAS

1. FIGURA 1. Señales Genéticas en el Desarrollo de Tumores.....	23
---	----

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A.	Fotografía. Subcultivo de las líneas celulares tumorales de seno y laringe.....	82
ANEXO B.	Fotografía. Cajas de cultivo celular de las líneas 1170, 1595 y HEP-2.....	82
ANEXO C.	Fotografía. Incubación de líneas celulares tumorales de seno y laringe	83
ANEXO D.	Fotografía. Cámara de irradiación de cobalto.....	83
ANEXO E.	Fotografía. Observación de líneas celulares posradiación.....	84
ANEXO F.	Fotografía. Conteo de colonias.....	84
ANEXO G.	Colonias con coloración posradiación.....	85

INTRODUCCIÓN

El Cáncer es una de las enfermedades crónicas que mas ha estado aumentando en los últimos años generando altos costos en sus tratamientos y que han llevado a las naciones del mundo a centrar su atención en la búsqueda de nuevos y mejores formas de manejo; por este motivo y examinando las expectativas de la región Surcolombiana nos hemos interesado en brindar un punto de partida para incursionar en este campo.

Buscando contribuir a la investigación en el área de la oncología, que empieza a surgir en nuestra región hemos querido de esta manera hacer un aporte en el estudio del cáncer de seno y laringe centrándonos en la radioterapia como alternativa terapéutica en búsqueda de nuevas soluciones.

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Experimental del Instituto Nacional de Cancerología, en donde realizamos cultivos de líneas celulares de tumores de seno y laringe, mediante técnicas estandarizadas previamente.

Estos grupos de células fueron sometidas a diversas dosis de irradiación para de esta forma identificar los efectos que esta produce en el crecimiento celular, en la inducción de muerte celular por apoptosis debido a daños en el DNA, inhibición de la proliferación. Haciendo posible de esta manera la reducción de la severidad de la enfermedad buscando una optimización de los tratamientos actuales.

La sensibilidad relativa de las distintas células y tejidos es la misma en los diferentes mamíferos que han sido estudiados. Sin embargo, bajo idénticas condiciones de exposición, los diversos tipos de células y tejidos exhiben marcadas diferencias en sus respuestas a una misma dosis de radiación, por esta

razón nos centramos en el estudio de las líneas celulares tumorales de seno y laringe en donde la respuesta a la radiación ionizante fraccionada es variada.

En esta investigación se trabajó con las líneas celulares 1170 y 1595 de cáncer de seno y HEP-2 de cáncer de laringe las cuales fueron sometidas a dosis fraccionada de radiación ionizante. Después de un periodo de 14 días posteriores a la irradiación se realizó un conteo de las colonias mayores de 50 células las cuales se consideran viables después del proceso. La dosis en la cual se observó mortalidad del 50% de la población celular (DL50) fue de 4 a 6 Gys. Además se observó mortalidad total de la población celular a 10Gys.

En la teoría se describe que para el cáncer de seno estadio I la dosis administrada varía desde 46,8 Gys hasta 50,4 Gys, dadas a dosis de 1,8-2 Gys diariamente, 5 veces por semana, en el estadio III se utiliza fraccionamientos entre 180 y 200 cGys por día, 5 veces por semana, hasta una dosis de 4.000 a 5.000 cGys. Se puede utilizar sobredosis al lecho del tumor, de acuerdo a la respuesta clínica, en el estadio IV en las pacientes con pobre o ninguna respuesta, la intención de tratamiento será paliativa y la dosis será de 3000 cGy. Se hará electiva la paliación con dosis única de 1000cGy, de acuerdo al estado general y pronóstico de la paciente.

Para el cáncer de laringe se suministran dosis 66-70 Gy al tumor primario y ganglios linfáticos comprometidos, en fraccionamientos de 1,8 Gy/día, cinco veces a la semana, para tratamiento radical con intención curativa se usan dosis de 70-72 Gy, en fraccionamientos de 1,8- 2 Gy/ día, cinco veces a la semana.

Esperamos que los resultados obtenidos en esta investigación sean de gran utilidad en el ejercicio clínico y terapéutico para poder brindar un apoyo en pro del mejoramiento de la calidad de vida de nuestros pacientes.

1. ANTECEDENTES

En el año 1994, el Comité científico de las Naciones Unidas para el Estudio de las Radiaciones Atómicas (UNSCEAR) presentó un informe a la Asamblea General sobre los efectos biológicos de las dosis bajas de radiación ionizante, concluyendo que ésta es un carcinógeno débil y una causa potencial aún más débil de enfermedades hereditarias. Aquí cabe aclarar que una dosis baja de radiación corresponde a una dosis total inferior a 200mSv y a tasas por debajo de 0.1mSv por minuto. Teniendo en cuenta la información radiobiológica y radioepidemiológica disponible, el UNSCEAR ha efectuado varias estimaciones cuantitativas

Se documenta que una microscópica bomba atómica dirigida al corazón del tumor podría convertirse en el futuro del tratamiento contra el cáncer. Un grupo de investigadores del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (EEUU) ha desarrollado y probado en ratones un generador atómico de tamaño minúsculo que se adhiere selectivamente a las células tumorales y las destruye mediante la radiación que produce.

El instrumento utilizado en los experimentos consiste en una jeringuilla de unos 10 centímetros que contiene el material radiactivo, que se inyecta directamente en el tumor. El profesor David Scheinberg, autor principal dijo que la ventaja de esta técnica frente a los tipos de radioterapia que se utilizan en la actualidad es que puede llegar a zonas del organismo donde otras no lo hacen. Sin embargo, este nuevo tratamiento presenta aún importantes inconvenientes. El profesor Scheinberg explicó que en los experimentos realizados en células y en ratones, sólo la mitad de las partículas radiactivas llegaron a penetrar en el interior de la célula tumoral.

Este hecho tiene como consecuencia que una parte de las radiaciones se pierde en el organismo, de modo que puede incidir sobre los tejidos normales y provocar daños en los órganos.

La base del método desarrollado es un átomo radiactivo, el actinio 225, encerrado en una cápsula que se acopla químicamente a un anticuerpo, un componente del sistema inmune que se obtiene por ingeniería genética y que es capaz de unirse a proteínas específicas situadas en la membrana celular. Este actúa a modo de timonel, puesto que conduce al elemento radiactivo hacia su proteína diana y por tanto, hacia la célula tumoral.

Una vez alcanzado el objetivo, el actinio libera partículas de radiación alfa que destruyen el ADN de la célula cancerosa provocando su muerte. Además, el actinio genera otros átomos hijos que también pueden producir radiaciones alfa de modo que el efecto letal se multiplica.

El trabajo de los investigadores estadounidenses se realizó en cultivos celulares de leucemia, linfoma, cáncer de mama, de ovario, de próstata y neuroblastoma. La acción del generador consiguió destruir todos estos tipos de células tumorales.

La técnica se estudió también en ratones con cáncer de próstata y con linfoma diseminado. En todos los casos se aumentó de modo significativo la supervivencia de los animales. Además, en muchos de los roedores con cáncer de próstata los niveles de un marcador específico que indica la presencia del tumor llegaron a hacerse indetectables.

El investigador principal afirma que son necesarios los datos farmacológicos en humanos para mejorar el método y desarrollar estrategias que permitan reducir los posibles efectos tóxicos de la radiación que se escapa del interior de las células tumorales (1).

En el Servicio de Radioterapia de la Unidad de Oncología del Hospital General de México, entre agosto de 1993 a diciembre de 1995, se realizó una investigación denominada “Radioterapia en el melanoma maligno, Experiencia con hipofraccionamiento en el tratamiento de las recurrencias locorregionales” en donde se menciona sobre altas dosis de radiación con hipofraccionamiento administradas en pacientes con recurrencias locorregionales de melanoma maligno. Un total de 28 lesiones en 22 pacientes con diagnóstico de melanoma maligno metastásico o recurrente fueron tratadas con altas dosis de radiación por fracción. El seguimiento osciló entre nueve y 30 meses (promedio 11.2 meses).

Fueron analizados dos esquemas de tratamiento: Esquema A: 40 Gy en ocho fracciones administradas en cuatro semanas y esquema B: 24 Gy en tres fracciones, una por semana. Se analizó la respuesta local a estas dosis y el control del dolor. Veintiún campos de tratamiento fueron tratados con el esquema A y siete con el esquema B. Se obtuvieron respuestas completas en siete campos de tratamiento, parciales (entre 50 y 90%) en 12 campos y menores del 50% o estatismo en nueve campos.

Se obtuvo paliación total del dolor en 18 pacientes. Existe evidencia de progresión de la enfermedad en seis pacientes, a pulmón en cuatro casos y óseas en dos. Seis pacientes se encuentran con vida y sin actividad tumoral, ocho están vivos con actividad tumoral y los ocho restantes se perdieron con actividad tumoral. El análisis de estos datos muestra que el melanoma maligno es más radiosensible de lo que tradicionalmente se había señalado y puede tener un manejo en el papel de estas lesiones, ya sea en la paliación local, en la satelitosis y en el control del dolor (2).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial; diferentes grupos de investigación vienen desarrollando estudios en busca de tratamientos que mejoren el pronóstico así como la calidad de vida de los pacientes con esta patología.

La radioterapia es parte integral del tratamiento de diversos tumores. Las radiaciones pueden ser utilizadas como tratamiento único, asociado a quimioterapia, o bien servir para reducir el tamaño de ciertos tumores para que luego puedan ser extirpados mediante cirugía. En otras ocasiones se utiliza como tratamiento secundario para eliminar los residuos de tumor que quedan tras una cirugía o una quimioterapia.

No siempre se utiliza como tratamiento curativo, a veces es tan solo un tratamiento conservador, es decir, que limite el tamaño de los tumores para mejorar la calidad de vida del paciente afectado por cáncer.

Con excepción de las mutaciones beneficiosas, que son muy contadas, la radiación produce siempre lesión en las células o en los tejidos. No se ha obtenido, hasta ahora, la denominada "dosis estimulante". Los únicos efectos estimulantes observados, bien pueden ser producto de la reacción misma de la lesión o de la destrucción de las sustancias inhibidoras, que dan como resultado un crecimiento anormal del tejido no inhibido.

“ *La enfermedad de las Radiaciones*”, es un término empleado para indicar el síntoma complejo que ocurre en pacientes sometidos a terapia por radiaciones. Sus características incluyen náuseas, vómitos, anorexia, pérdida de peso, fiebres y hemorragias intestinales.

"El síndrome agudo de Radiación", es aquel síntoma complejo que ocurre por exposición del cuerpo entero o una gran porción del mismo, a una elevada dosis de radiación, en corto tiempo.

Por alguna razón no comprendida todavía, la exposición a las radiaciones aumenta en el hombre la incidencia de ciertos tipos de cáncer. Gran cantidad de estudios en animales han establecido que la exposición a las radiaciones produce una aceleración del proceso de envejecimiento, dando como resultado un acortamiento, no especificado del tiempo de vida.

En 1927, Muller informó que la exposición a las radiaciones aumentaba la proporción de mutaciones genéticas en la mosca de la fruta. Su trabajo ha sido confirmado en otras especies. La radiación es capaz de reducir la fertilidad, siendo tal reducción dependiente de la dosis. Por eso, podemos observar toda una gama de efectos que van desde la reducción en fertilidad a la esterilidad permanente.

Para aplicar la radiación como alternativa terapéutica es necesario contar con dosis optimizadas que den respuestas adecuada a los esquemas de tratamiento para el control de la severidad del cáncer y reducir la presentación de efectos adversos; por lo cual planteamos la siguiente pregunta:

¿Cuál es el efecto de la radiación ionizante a dosis fraccionada en líneas celulares de cáncer de seno y laringe en cultivo en el Instituto Nacional de Cancerología durante el periodo de Mayo 12 a junio 6 del 2003?

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran morbilidad y mortalidad que representa el cáncer en el mundo. El cáncer de laringe representa alrededor del 2,3% de todas las neoplasias en el hombre y del 0,4 % en la mujer, excluyendo los tumores de la piel. La localización más frecuente es a nivel glótico, seguido por el supraglótico y por el subglótico. En la mayoría de los países su alta incidencia se correlaciona también con una elevada incidencia de cáncer de pulmón. El cáncer laríngeo es básicamente una enfermedad de personas ancianas, con una mayor incidencia entre la 6ª y la 7ª décadas de la vida. El cáncer de seno es el segundo tumor maligno más frecuente en mujeres, después del cáncer de cuello uterino y es la causa más frecuente de muerte por cáncer en mujeres de 15 a 54 años (3).

Por estas razones en nuestro país consideramos de vital importancia el hallazgo de nuevas alternativas terapéuticas que contribuyan al mejoramiento del pronóstico y calidad de vida de las pacientes con cáncer.

Al cultivar líneas celulares de cáncer de seno y laringe y utilizar en ellas la radiación adecuada se establecería los efectos en la proliferación e inducción de apoptosis, que se emplearía para reducir el tamaño tumoral y asegurar una eficaz muerte celular, pudiendo así establecerse una optimización de la terapia.

Después de establecer las dosis optimas con radiación en diferentes tejidos tumorales a partir de cultivos in vitro se podría hacer un control y e incluso tratamiento más temprano de la enfermedad antes de que los paciente sean sometidos a una quimioterapia o a una intervención quirúrgica conservadora o radical.

Con este trabajo se pretende hacer un aporte científico a la investigación en nuestra región Surcolombiana de las alternativas terapéuticas que hasta hoy se tienen de esta patología incursionando en el mundo del cáncer el cual es uno de los más explorados pero con más grandes retos en el hallazgo de tratamientos eficaces.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Determinar los efectos de la radiación ionizante a dosis fraccionadas en líneas celulares de cáncer de seno y laringe en cultivo en el Instituto Nacional de Cancerología durante el periodo de Mayo 12 a junio 6 del 2003, con el fin de lograr una optimización de la terapia en los tumores de seno y laringe.

4.2 ESPECIFICOS

- Lograr cultivos de células de cáncer de seno y laringe viables para el estudio.
- Establecer las dosis de radiación óptimas para la inducción de apoptosis de las células de cáncer de seno y laringe.
- Determinar la dosis letal 50 de las células cancerosas en cultivo.
- Observar el porcentaje de células que pierden su capacidad de división después de ser tratadas con radiación ionizante.

5. MARCO TEORICO

5.1 GENERALIDADES DEL CANCER

5.1.1 BASES MOLECULARES DEL CANCER

El origen del cáncer ha sido motivo de extenso estudio en las últimas dos décadas. Con el uso de las herramientas provenientes de la biología molecular, se ha podido dilucidar las bases moleculares del cáncer y determinar los elementos potenciales o de riesgo a nivel molecular que determinan los cambios que hacen que una célula normal se transforme o "malignice". El término "cáncer" es referido a por lo menos una centena de enfermedades que pueden originarse de cada tejido en el organismo humano. En tal sentido cada tipo de cáncer tiene características muy particulares que los distinguen entre si. Sin embargo, muchas de las bases moleculares responsables de estos distintos tipos de cáncer son compartidas entre ellos y pueden ser usadas en favor del paciente en la obtención de una mejor respuesta a las terapias convencionales e incluso en la prevención de los mismos (4).

Los tumores son el resultado de la subversión de los mecanismos normales que controlan el crecimiento, la localización y la mortalidad de las células. La pérdida de los mecanismos normales de control se producen al generarse mutaciones en tres amplias categorías de genes:

- Los **oncogenes**, son mutaciones de genes estimuladores normales de la proliferación celular (**proto-oncogenes**). La mutación tiene como consecuencia un exceso de función del gen que empieza a producir señales ininterrumpidas que obligan a la célula a dividirse. Ocurre en uno de los alelos en una célula somática, y es dominante respecto del alelo normal. Toda la progenie derivada de esa célula iniciará una transformación tumoral. El tumor así originado es monoclonal y usualmente esporádico.

Este tipo de mutaciones ocurren espontáneamente durante la vida y se necesita más de un evento mutacional para que se produzca la transformación tumoral de una célula, por lo que la *probabilidad de padecer un tumor de este origen aumenta con la edad*. Un mismo oncogén puede causar tumor en distintos tejidos, aunque existe cierta relación entre tipo de tumor y oncogén.

- **Genes supresores de tumores (Anti-oncogenes)** tienen también una actividad reguladora de la proliferación celular, pero son *reguladores negativos* (supresores). Se expresan en tejidos en diferenciación como los embrionarios o los epitelios, que están en permanente renovación. La alteración de su función está claramente relacionada con algunos tumores de la infancia. Los dos primeros genes onco-supresores que se conocieron Rb y p53, resultaron tener un papel fundamental, el primero en la regulación del ciclo celular y el segundo, como agente de seguridad contra los errores en la replicación del DNA.

Es la ausencia de función de ambos alelos lo que desencadena el desarrollo tumoral. Por lo tanto a nivel celular se comportan como recesivos respecto del alelo normal.

Estas mutaciones ocurren por separado, con un considerable intervalo de tiempo entre ambas. Si *las dos mutaciones* ocurren en una célula *somática*, se desarrollará un tumor único y el caso será esporádico (5).

La proteína p53 se encuentra en muy baja concentración en los núcleos de las células normales. Ante la presencia de radiación ultravioleta, radiación X, infección viral y químicos mutagénicos, se produce un aumento notable de su concentración. La reacción p53 se produce al romperse la doble cadena del DNA. Puede ser despertada por las enzimas de restricción.

- Actúa como un interruptor del ciclo celular, por lo que se ubica corriente arriba en la red reguladora del ciclo. Cuando se produce la reacción p53, una de las proteínas que queda bajo su control es RB1. Esto ocurriría porque p53 activa el

gen p21. La proteína p21 es inhibidora universal de las quinasas dependientes de ciclina, por lo que puede inhibir la progresión del ciclo en cualquiera de los puntos críticos.

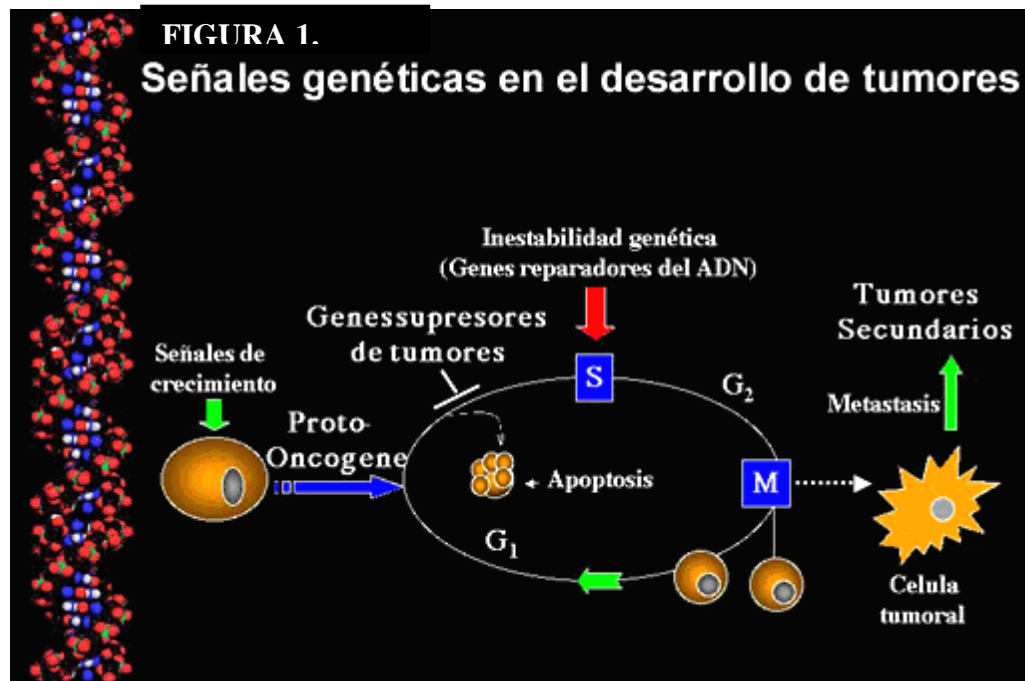
- Puede unirse al factor de replicación del DNA, inhibiendo directamente la síntesis de DNA.
- Puede desencadenar la apoptosis o muerte celular programada.

Su función es impedir que DNA dañado complete un ciclo de replicación (que sabemos resulta imprescindible para fijar una mutación en una línea celular). La detención del ciclo da tiempo para permitir la reparación del DNA. Si el daño es de gran magnitud, deriva la célula a la apoptosis.

La proteína p53 no interviene en el ciclo celular normal. En forma experimental se han conseguido ratones con anulación homocigótica de p53. Pueden llegar a adultos sin dificultad pero sufren una altísima incidencia de tumores (superior a 70% a los 6 meses).

- **Enzimas reparadoras del ADN** cuya mutación determina un alto grado de inestabilidad genética.

Mutaciones en estos genes también se correlacionan con cambios en la expresión de proteínas de superficie, secreción de ciertas proteínas y movilidad celular que contribuyen al desarrollo y crecimiento ectópico de células tumorales determinando un patrón de metástasis (Figura 1).



La noción de que el cáncer podría ser causado por cambios asociados a los genes surgió al comienzo del siglo diecinueve cuando se notó la predisposición a desarrollar cáncer dentro de las familias. Al comienzo del siglo veinte se había podido observar, usando microscopía de luz, que los cromosomas provenientes de células cancerosas frecuentemente tenían tamaños y formas anormales, en contraste con los provenientes de las células normales. Recientes hallazgos han encontrado relación entre la susceptibilidad a cáncer y la pérdida de la habilidad de las células de reparar el ADN dañado por múltiples estímulos.

Estas observaciones sugieren que el cáncer puede surgir por una falta de regulación en la forma en que las células proliferan, al verse afectados los genes que controlan esta función. También se ha determinado que la falta de regulación en los procesos que regulan la muerte celular (Apoptosis) son suficientes mas no necesarios en el desarrollo de tumores.

Otra de las consecuencias de la activación de oncogenes o de la pérdida de la función de los genes supresores de tumores es el interferir con el proceso normal de envejecimiento celular o senescencia. Normalmente, la senescencia celular se correlaciona con la disminución progresiva en el tamaño de los telómeros (

Secuencias repetitivas del hexanucleótido 5'-TTAGGG-3' al final de cada cromosoma, la cual confiere estabilidad estructural al mismo). Los telómeros son sintetizados por un enzima llamada Telomerasa (ribonucleo-proteína ADN polimerasa) que suele ser mucho mas activa en células tumorales pero no muy activa en células normales (6).

5.1.2 CÁNCER DE SENO

Epidemiología

La incidencia mundial se ha incrementado a partir de 1960, pero el número de muertes se mantiene relativamente estable, posiblemente debido a su detección en estados más tempranos, y también a mejores tratamientos para los estados más avanzados. En Colombia el cáncer de seno es el segundo tumor maligno más frecuente en mujeres, después del cáncer de cuello uterino y es la causa más frecuente de muerte por cáncer en mujeres de 15 a 54 años (7).

Etiopatogenia

Factores de riesgo: Diversos factores aparecen asociados con riesgo de cáncer de seno, pero en menos del 70% de las mujeres con este diagnóstico es posible identificar un factor de riesgo definido. Un factor de incremento en el riesgo es la mayor duración de la vida menstrual, como resultado de menarquia precoz y/o menopausia tardía. Las mujeres nulíparas exhiben un mayor riesgo, así como las mujeres cuyo primer embarazo se presenta después de los 30 años de edad. El uso de terapia de suplencia hormonal con estrógenos en mujeres postmenopaúsicas ha demostrado disminución en el riesgo de osteoporosis y de enfermedad coronaria, pero también un leve incremento en el riesgo de cáncer de seno con el uso continuo por más de 5 años. El riesgo de cáncer de seno por el uso prolongado de anovulatorios orales parece ser obviado con el uso de concentraciones mucho menores de estrógenos. No hay evidencia de que la dieta

rica en grasa aumente el riesgo de cáncer de seno. La presencia de una lesión benigna no proliferativa no se asocia con aumento en el riesgo de cáncer de seno, en tanto que una lesión proliferativa con atipia sí lo aumenta; el diagnóstico de hiperplasia atípica es considerado como premaligno.

Aproximadamente 5% a 10% de las pacientes con historia familiar de cáncer de seno pueden ser parte del Síndrome de Cáncer Heredo-Familiar (8).

Cuadro clínico

La presentación clínica del carcinoma de seno es de espectro amplio, que varía desde la ausencia de signos y síntomas en cuya situación el diagnóstico es imagenológico, hasta cuadros clínicos evidentes que caracterizan los estados avanzados, como son una masa firme e indolora, alteraciones de la piel, tales como retracción, enrojecimiento, edema, ulceración y/o retracción del pezón (9).

En la enfermedad de Paget, la cual es indicativa de un cáncer subyacente, hay prurito y eczema de la piel del pezón, signos que pueden confundirse fácilmente con alteraciones benignas de la piel.

La secreción por el pezón no es un signo específico de cáncer, pero debe conducir a la sospecha de neoplasia subyacente, especialmente en los casos de telorragia (secreción sanguinolenta por el pezón).

La extensión axilar se manifiesta por ganglios palpables o visibles en la proyección oblicua de la mamografía. Los ganglios pueden ser móviles o fijos, o ser palpables como un conglomerado. Los mismos hallazgos pueden estar presentes en la región supraclavicular. Algunas pacientes pueden presentar adenopatía axilar como primera manifestación clínica, sin que se pueda palpar una masa mamaria (10).

Detección precoz y temprana

Las recomendaciones sugeridas en la actualidad son:

Edad	Recomendación	Evidencia	por estudios
20 años o más	Autoexamen mensual	No	
40 años o más	+ examen médico anual	No	
40-49 años establecido	+ Mamografía anual	Beneficio	
50 años o más establecido	+ Mamografía anual	Beneficio	

Estadificación

Estado	TNM
0	Tis N0 M0
I	T1 N0 M0
IIA	T0 N1 M0
	T1 N1 M0
	T2 N0 M0
IIB	T2 N1 M0
	T3 N0 M0
	T3 N1 M0
IIIA	T0 N2 M0
	T1 N2 M0
	T2 N2 M0
	T3 N1 M0
IIIB	T3 N2 M0
	T4 cualquier N M0
	Cualquier T N3 M0
IV	Cualquier T, cualquier N M1

Diagnóstico

Mamografía: La decisión de realizar biopsia se apoya en los hallazgos mamográficos según la clasificación BI-RADS propuesta por el Colegio Americano de Radiología. Las categorías 0, 4 y 5 ameritan estudios complementarios y/o estudio histológico.

Ecografía: Se realiza como complemento del examen clínico o de los hallazgos mamográficos y también para guiar procedimientos invasores de tipo diagnóstico.

Gamagrafía mamaria y resonancia magnética de seno. Son métodos de apoyo que se utiliza en casos especiales de difícil diagnóstico y seguimiento.

Biopsia. El método utilizado para la obtención de la muestra depende de si la lesión es palpable o no palpable:

Lesiones no palpables: Se basa en hallazgos imagenológicos; los procedimientos diagnósticos son:

Biopsia dirigida por estereotaxia

Biopsia dirigida por ultrasonido

Lesiones palpables: El material histológico puede ser obtenido mediante:

Citología por aspiración con aguja fina (BACAF)

Biopsia con aguja cortante (TRUCUT)

Biopsia abierta (incisional o escisional)

La muestra debe ser suficiente para hacer estudios de inmunohistoquímica (11).

Tratamiento

Los lineamientos generales del manejo son definidos según el estado clínico.

Estudios aleatorizados han establecido que para la mayoría de la mujeres con cáncer de seno temprano, la escisión tumoral amplia con preservación del seno, seguida radioterapia es el tratamiento de elección. La radioterapia es parte integral del tratamiento conservador del seno. El carcinoma ductal in situ y el carcinoma lobular pueden ser tratados adecuadamente con cirugía conservadora o radioterapia solamente, o sea con tratamiento local-regional. (12).

En algunas mujeres el cáncer de seno es una enfermedad local, pero la probabilidad de recurrencia es alta en mujeres con ganglios axilares histológicamente positivos. La disección axilar provee información pronóstica, pero tiene un mínimo o ningún efecto terapéutico, especialmente en mujeres con axila clínicamente negativa, y es responsable de la mayoría de la morbilidad asociada con cirugía de seno. Se ha incrementado el interés en el desarrollo de métodos alternativos para obtener información pronóstica, como el estudio del ganglio centinela, cuya técnica se explica más adelante (13)

5.1.3 CÁNCER DE LARINGE

Factores de riesgo

- Consumo de tabaco
- Consumo excesivo de alcohol
- Combinación del consumo de tabaco y alcohol
- Exposición a asbesto
- Exposición crónica al polvo de madera
- Exposición a químicos industriales (manejo del cuero, madera, pinturas, níquel, mostaza).
- Queratosis laríngea
- Papiloma laríngeo
- Deficiencias en la dieta (14)

ETAPAS DE CÁNCER DE LA LARINGE

Etapa I

El cáncer sólo se encuentra en el área donde comenzó y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos del área o a otras partes del cuerpo

región supraglótica

El cáncer se encuentra sólo en una área de la región supraglótica y las cuerdas vocales pueden moverse normalmente.

glotis

El cáncer sólo se encuentra en las cuerdas vocales

región subglótica

El cáncer no se ha diseminado afuera de la región subglótica.

Etapa II

El cáncer sólo se encuentra en la laringe y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos en el área o a otras partes del cuerpo. La definición exacta de la etapa II dependerá de dónde comenzó el cáncer, del siguiente modo:

región supraglótica

El cáncer está en más de una área de la región supraglótica, pero las cuerdas vocales pueden moverse normalmente.

glotis

El cáncer se ha diseminado a la región supraglótica o a la región subglótica o a ambas. Las cuerdas vocales pueden o no moverse normalmente.

región subglótica

El cáncer se ha diseminado a las cuerdas vocales, que pueden o no moverse normalmente.

Etapa III

El cáncer no se ha diseminado al exterior de la laringe, pero las cuerdas vocales no se pueden mover normalmente, o el cáncer se ha diseminado a tejidos próximos a la laringe.

El cáncer se ha diseminado a un ganglio linfático en el mismo lado del cuello que el cáncer, y el ganglio linfático mide no más de 3 centímetros (apenas un poco más de 1 pulgada).

Etapa IV

El cáncer se ha diseminado a tejidos alrededor de la laringe, como la faringe o los tejidos en el cuello. Los ganglios linfáticos en el área pueden o no tener cáncer.

El cáncer se ha diseminado a más de un ganglio linfático en el mismo lado del cuello que el cáncer, a ganglios linfáticos en uno o ambos lados del cuello, o a cualquier ganglio linfático que mida más de 6 centímetros (más de 2 pulgadas).

El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo.

DIAGNÓSTICO

El síntoma más temprano de los tumores glóticos es la disfonía. Esta puede ocurrir también cuando las lesiones de la supraglotis o la subglotis invaden o se extienden a las cuerdas vocales. Cuando el tumor invade y obstruye las vías aéreas, se produce el estridor laríngeo; cuando se extiende a la faringe, el

paciente se queja de ardor de garganta y de disfonía. Algunas veces, especialmente en los casos más avanzados, puede haber dolor en el oído y en todo el lado afectado.

También puede observarse asimetría y anormalidades de la piel, resultantes de la expansión del tumor o por compromiso del cartílago tiroides. La palpación del cuello puede revelar la expansión del tumor. La pérdida de la crepitación normal en la laringe puede indicar infiltración del tumor a la fascia posterior de la laringe. Siendo frecuente el compromiso ganglionar, es indispensable una cuidadosa y ordenada palpación del cuello.

La laringoscopia indirecta es esencial para determinar la extensión del tumor. Al mismo tiempo, deben explorarse cuidadosamente la orofaringe y la hipofaringe. La laringoscopia directa bajo anestesia es necesaria en los casos en que no es posible realizar nasofibrosocopia.

TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE LA LARINGE

Existen tratamientos para todos los pacientes con cáncer de la laringe. Se usan tres clases de tratamiento (15):

- radioterapia
- cirugía
- quimioterapia

5.2 CULTIVOS CELULARES

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas de la embriología. Wilhem Roux mantuvo en el año 1885 células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. El zoólogo americano R.G. Harrison es considerado el iniciador de los cultivos de

tejidos animales, en 1907. Harrison fue el primer autor que empleó técnicas in vitro para el estudio de fenómenos in vivo, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios. Pudo observar el crecimiento de los axones de los neuroblastos, y estableció que el axón se formaba por expansión a partir del cuerpo neuronal y no por fusión de una cadena de células. El cultivo se realizaba en una gota de linfa del anfibio que colgaba de un cubreobjetos sobre una cámara sellada.

La primera limitación para el establecimiento de cultivos era lograr un medio nutritivo adecuado. Burrows (1910) empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel.

Burrows y Carrel realizaron los primeros intentos de establecer cultivos de células de mamífero, y consiguieron mantener explantes obtenidos a partir de perros, gatos y conejos de indias, así como en el crecimiento de tumores sólidos. Demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivo. Los medios empleados fueron plasma conjuntamente con extractos de embrión (16).

Rous y Jones (1916) emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describen para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación que aún hoy día se utilizan.

En 1913 Carrel demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un animal, embrión de pollo, durante un período de tiempo superior al de la vida de éste. Mantuvo en cultivo células de pollo durante 34 años (Sharp, 1977). Gran parte del éxito en el mantenimiento de los cultivos se debió al desarrollo del denominado frasco de Carrel.

A partir de los años 40, con el aislamiento de los primeros antibióticos, se desarrollaron numerosas aplicaciones de entre las que podemos destacar :

1952. Gry y col. (Grey, Coffman y Kubicek, 1952) establecen la primera línea celular continúa, las actualmente bien conocidas células HeLa . El medio empleado era extremadamente complejo y poco definido: plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano.

1961 Hayflick y Moorhead usaron por primera vez antibióticos para prevenir la contaminación de los cultivos de fibroblastos. Pudieron mantener estos cultivos durante unos 12 pases, pero no consiguieron establecer líneas estables.

1965 Ham introduce el primer medio definido libre de suero capaz de mantener algunas células de mamífero en cultivo indefinidamente (Ham, 1965).

1975 Kohler y Milstein establecen la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales (Koehler y Milstein,1975). El establecimiento de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales les valió el Premio Nobel.

1976 Sato y col. Publicaron sus trabajos en los que demuestran que las diferentes líneas celulares requieren mezclas distintas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero. (17).

En los últimos años la aplicación de la tecnología del cultivo celular ha permitido grandes avances en la comprensión de los mecanismos implicados en los procesos intracelulares e intercelulares con el establecimiento de co-cultivos.

A pesar de que el primer animal del que se establecieron cultivos celulares era un anfibio, poiquilotermo, rápidamente se centró el interés en el cultivo de células de animales homeotermos, especialmente humanas, por su gran interés médico. Sin embargo en los últimos años, y especialmente motivado por el control de plagas e

infecciones en agricultura y piscicultura, se ha desarrollado notablemente el establecimiento de líneas celulares de invertebrados.

Conceptos actuales de cultivo celular.

Actualmente se entiende por cultivo celular un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células 'in vitro', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración hablaremos de diferentes tipos de cultivos: de órganos, explantes, primarios o secundarios etc (18).

5.2.1 TECNICAS DE CULTIVO CELULAR

La posibilidad de observar el crecimiento y desarrollo de células vivas creciendo sobre el microscopio en uno de las aplicaciones más interesantes de la microscopía.

Estos estudios nos permiten estudiar el comportamiento de micropoblaciones celulares y cuantificar fenómenos que ocurren en células vivas a lo largo del tiempo tanto desde el punto de vista de la morfología como la fisiología. Los dos tipos de estudios sobre micropoblaciones celulares que más se utilizan son:

1. Desarrollo. Tratar de estudiar el comportamiento normal de las células.
2. Estudio de cambios medioambientales sobre las células: fármacos, sobreexpresión y anulación de genes, etc. (19)

Microambiente.

Es fundamental tener perfectamente controlado el microambiente para poder permitirnos asegurar que cualquier cambio en el comportamiento de las células sólo es atribuible al comportamiento celular en cada situación concreta y no a unas deficientes condiciones de cultivo.

Los principales elementos a controlar son:

Medio de cultivo. Se suele usar el mismo que se emplea para cada célula en condiciones de cultivo estándar.

Gases (O₂ y CO₂) y pH. Debe garantizarse un 20% de O₂ (niveles atmosféricos) y un 5% de CO₂ en el sistema. Cuando no es posible controlar el CO₂, los medios de cultivo que utilizan bicarbonato como tamponador de pH se alcalinizan (pH > 8).

Osmolaridad-humedad. Debe garantizarse una ambiente húmedo, si fuese seco se propicia la evaporación del agua del medio de cultivo lo que incrementará lo osmolaridad del mismo.

Temperatura. El estricto control de la temperatura es muy importante al tratarse de un factor crítico en la mayoría de los experimentos con células de mamíferos cuyo metabolismo óptimo es a 37°C . Cuando en un experimento aparecen problemas y datos no explicables, presumiendo que el resto del microambiente es correcto, la causa suele ser un deficiente ajuste de la temperatura.

Substrato del cultivo. Es el dispositivo sobre el que se colocan físicamente las células de modo directo.

Los dos sistemas de microcultivo para observación más empleados son:

- Cultivo abierto. Sobre en frascos o placas similares al cultivo de células tradicional.
- Sistema cerrado. Cámaras cerradas con perfusión de medio de cultivo (20).

SISTEMA DE CÁMARAS DE CULTIVO

Sistema abierto

Como en todos los fenómenos de la naturaleza tiene el principio de indeterminación y debemos decidir que es lo preferente: tiene unas condiciones plenamente controladas y reproducibles (idénticas a las del cultivo celular en estufa) con una calidad óptica mediana o una mayor calidad óptica con un cultivo sobre cámara.

Actualmente esta decisión va dejando de ser un problema por la posibilidad de disponer de:

- Sistemas de cultivo con fondo de cristal del espesor de un cubreobjetos.
- Objetivos de gran calidad y larga distancia de trabajo.
- Mayor calidad óptica del plástico utilizado en cultivo de tejidos.
- Posibilidad de control de las condiciones térmicas aislando todo el equipo.

MATERIALES BÁSICOS

No existe el sistema de filmación de células vivas perfecto. Las condiciones de cultivo más adecuadas y más próximas a las empleadas en estufas de cultivo con una calidad de observación más que aceptable:

- Microscopio invertido atemperado a 37° mantenido a esa temperatura.
- Platina termostatzada con ajuste específico de temperatura real para cada tipo de frasco o placa de cultivo.
- Cámara de incubación situada encima de la platina y conteniendo el frasco de cultivo. En el interior de dicha cámara se garantiza la atmósfera húmeda de aire con CO₂ al 5%. En este sistema lo que se perfunde no es el medio, sino el aire perfectamente equilibrado.
- Objetivos de los dos tipos: larga distancia de trabajo y de amplia apertura numérica.
- Frascos de cultivo con fondo de cristal (cubreobjetos), o de plástico de alta calidad (21).

5.3 RADIOTERAPIA

La radiación ionizante fue descubierta en 1895; su acción se basa en la producción de ionización. El agua es el componente celular más abundante, y al recibir dosis de radiación mayores a 33eV de energía su átomo de hidrógeno pierde un electrón y forma radicales libres hidroxilo, importantes para la inducción del daño celular. Las partículas cargadas y los radicales libres lesionan el DNA, inducen aberraciones cromosómicas que comprometen la capacidad de división y la célula muere. La letalidad se relaciona con la dosis de radiación y el número de rupturas de la doble cadena del DNA.

EFECTOS BIOLÓGICOS

En exposiciones de corta duración, los efectos biológicos observados siguen generalmente un modelo de secuencias. En exposiciones prolongadas, estos efectos ocurren en forma simultánea, no siendo observables sus resultados "en algunas oportunidades. La secuencia de eventos posteriores a la exposición, generalmente puede clasificarse así:

Período latente

A continuación del evento inicial de la radiación y antes de que ocurra la primera manifestación detectable, habrá un "tiempo de incubación". Este período, conocido como el período latente, representa simplemente el intervalo de tiempo que transcurre antes de que se pueda detectar el daño. El período de latencia varía entre amplios límites de tiempo. Los efectos biológicos producidos por la radiación, se dividen de acuerdo al período de latencia en efectos agudos y a largo plazo. Los efectos agudos son aquellos que se manifiestan en cuestión de minutos, días

o semanas. Los efectos a largo plazo son aquellos que hacen su aparición después de varios años, décadas o generaciones.

Una teoría relacionada con el período de latencia sostiene que las células deben recuperarse de la inhibición mitótica producida por la radiación y que al entrar en mitosis, mueren debido al daño severo producido en sus cromosomas, como resultado de su radiación directa o indirecta.

En términos generales, cuanto mayor la dosis, más rápida la aparición de la lesión. En la práctica, exceptuando los accidentes o actos negligentes de importancia, las dosis son pequeñas y el tiempo de latencia puede ser bastante largo (de 25 o más años).

Período de Efectos Demostrables sobre las Células y Tejidos

Durante o inmediatamente después del "período de latencia", se observan algunos efectos discretos por el examen microscópico de los tejidos o, indirectamente, a través de métodos físicos. Uno de los fenómenos mayormente observados durante el crecimiento del tejido expuesto a las radiaciones, es la cesación de la mitosis o división de las células. Esta cesación puede ser temporal o permanente dependiendo ello de las dosis de radiación recibida. Otros efectos observados son: la ruptura de cromosomas; aglutinación de la cromatina; formación de células gigantes; otras mitosis anormales; granulación aumentada del citoplasma; cambios en pigmentación; en alteración en la movilidad y actividad ciliar; citolisis; vacuolización; alteración de la viscosidad del protoplasma; alteración en la permeabilidad de la pared celular.

Es probable que éstos representen sólo una parte de los procesos celulares que ocurren, debiéndose señalar que gran número de ellos pueden repetirse individualmente por acción de otros estímulos. La gama completa de efectos mencionados no es reproducible por un solo agente químico. (Es interesante

anotar el hecho de que las mostazas nitrogenadas copian en algunos casos, tales efectos.)

Período de Recuperación

Subsecuente a la exposición, puede lograrse en cierto modo la recuperación. Este período se manifiesta principalmente en el caso agudo que ocurre en cuestión de días o de semanas, después de realizada la exposición; hay, sin embargo, un daño residual, no recuperable, que se toma como base para los efectos a largo plazo.

La curación puede lograrse mediante el reemplazo del tejido dañado o mediante la recuperación de las células lesionadas. La cura por reemplazo es bien conocida, por ser el principal modo de recuperación del tejido lesionado mecánicamente. La cura por recuperación de las células es menos factible, pero se ha demostrado que puede ocurrir. Así por ejemplo, si administramos a un tejido una dosis de 700 roentgens/hora, para conseguir una lesión similar mediante dos dosis administradas en intervalos de 24 horas, necesitaremos sólo 535 roentgens de dosis. Esto significa que en 24 horas, la recuperación compensa el efecto de 370 roentgens ($2 \times 535R = 1070R$). En este caso, el restablecimiento por reemplazo se desecha por lo breve del tiempo.

Prácticamente, no hay distinción entre las curas mencionadas, lo que realmente interesa es el resultado neto de la "recuperación" (22).

DETERMINANTES DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS

Cantidad Total de Radiación Absorbida

La palabra "dosis" es sinónima de la cantidad de radiación absorbida. Tal como ocurre con la mayoría de los agentes farmacológicos, existe una relación cuantitativa entre la extensión del daño y su dosis. Si llevamos a un gráfico la

dosis vs su efecto en los tejidos, la curva resultante puede aparecer con dos formas diferentes. La curva resultante no es lineal sino más bien tiene la forma de "S"; es muy probable que casi todos los efectos agudos de radiación sean de esta clase. Sin embargo, conforme se obtengan medios más refinados de medición, la mayoría de ellos caerá dentro de la clase "sin-umbral".

La otra curva representa la clase "sin-umbral", que muestra la relación lineal existente entre la dosis y su efecto. Para lograr este resultado, no existen las dosis mínimas; en este caso, cualquier cantidad de dosis produce el mismo efecto sin tener en consideración otra dosificación anterior. Está demostrado que los efectos genéticos producidos por las radiaciones siguen esta clase de curva. Hay considerable evidencia de que tanto el acortamiento del promedio de vida, como el efecto carcinogénico siguen este tipo de curva "sin-umbral".

Las implicaciones de estas dos curvas en el establecimiento de límites de exposición máxima permisible son de gran importancia.

La cantidad total de radiación absorbida en un tejido, es función de muchas variables, entre las que mencionaremos el tipo de radiación, su energía, la sustancia a irradiar. En la mayoría de las aplicaciones biológicas, la radiación alfa y beta es completamente absorbida por el tejido, mientras que los rayos-X y gamma lo son en forma parcial. En general, para un tipo dado de radiación, cuanto mayor es su energía, mayor su penetración. Sin embargo, para los diferentes tipos de radiación, puede haber una variación enorme en la profundidad de penetración (por ejemplo: una radiación X de 250 kV es mucho más penetrante que una radiación alfa de 3 MeV). Generalmente el alcance de una radiación cualquiera, es inversamente proporcional a la densidad del material absorbente.

Velocidad de Absorción

La velocidad con que se administra o absorbe la radiación, es de gran importancia cuando se quiere determinar sus efectos. Puesto que hay un grado considerable

de recuperación en los efectos agudos de radiación, una dosis total cualquiera producirá un efecto menor que el agudo, si la damos dividida en subdosis (en lugar de una sola exposición). Sin embargo, en razón de los efectos a largo plazo, probablemente la velocidad de absorción no es importante.

Área Expuesta

Ordinariamente, cuando se hace referencia a las dosis al nivel máximo permisible de exposición o a la dosis letal media, suponemos que la dosis es suministrada al cuerpo entero. La denominación "radiación de cuerpo entero" es importante, ya que pueden aplicarse grandes dosis de radiación, en áreas localizadas (como en terapia), con poco peligro para la salud, pero que serían mortales si se aplicaran al cuerpo entero. Así por ejemplo, una persona puede exponer uno de sus dedos a 1000 R experimentando muy poco efecto su salud, excepto la lesión localizada en el dedo, siguiendo la curación y cicatrización de la misma. Si la misma dosis la hubiéramos suministrado al cuerpo entero, ésta hubiera resultado fatal. Hay evidencia de que los órganos hematopoyéticos, son los más radiosensibles cuando se irradia al cuerpo entero; la protección de estos órganos disminuirá el efecto producido en el cuerpo entero.

Especies y Variabilidad Individual

Especies diferentes muestran una amplia variación en la respuesta a exposiciones idénticas de radiación. Un ejemplo de esta variación se ve en las dosis letales medias (MLD), obtenidas en animales expuestos a los rayos X de 200 kV; así para ratones es de 500 R; cobayos, 250 R; hombre, 450 R; conejos, 875 R. Existe también una variación considerable en la respuesta dentro de las especies. Así,

dos razas dentro de una misma especie, pueden variar en sus respectivas dosis letales medias (MLD), hasta en un 50, %.

Esta variación individual no es característica propia de la radiación ionizante. Ocurre en la mayoría de los casos donde se utilizan cualquier tipo de estimulantes fisiológicos (físicos, químicos o biológicos) (23).

Sensibilidad Relativa de Células y Tejidos

Aparentemente la amplia variación entre especies, está asociada con el metabolismo total de la especie individual, ya que sin tener en cuenta la especie comprometida, los cambios histológicos reflejan la dosis con bastante precisión. Por ejemplo, si se dieran a cobayos y conejos 250 R, de rayos-X de 200 kV, serían evidentes los mismos cambios histológicos en los tejidos de ambas especies y aun cuando esta dosis podría matar al 50 % de los cobayos, sólo produciría una enfermedad pasajera en los conejos. La sensibilidad relativa de las distintas células y tejidos es la misma en los diferentes mamíferos que han sido estudiados. Sin embargo, bajo idénticas condiciones de exposición, los diversos tipos de células y tejidos exhibirán marcadas diferencias en sus respuestas a una misma dosis de radiación. Parece que no todas las células y tejidos son igualmente sensibles o vulnerables a las radiaciones. Existen varias generalizaciones que nos permiten predecir el grado de radiosensibilidad de un tipo particular de célula o tejido. Las células más activas y que crecen con mayor rapidez, tienden a ser las más radiosensibles en un tejido cualquiera. Los tejidos y células que son menos especializados o menos diferenciados, tienden a ser más vulnerables a la radiación. En general, el núcleo de una célula es más radiosensible que el citoplasma; de aquí que una célula con bastante citoplasma no sea tan afectada como aquella que contiene más material en el núcleo. Observaciones experimentales sustentan estas generalizaciones. Sobre la base de estas generalizaciones, puede aceptarse la siguiente lista de

células comunes y/o tejidos, agrupados de acuerdo a un orden decreciente de radiosensibilidad:

1. El tejido linfático, muy sensible, particularmente los linfocitos
2. Células rojas jóvenes, halladas en la médula ósea
3. Las células que revisten el canal gastrointestinal
4. Células de las gónadas; los testículos son más sensibles que los ovarios
5. Piel, particularmente la porción que rodea el folículo capilar
6. Células endoteliales vasos sanguíneos y peritoneo
7. Epitelio del hígado y adrenales
8. Otros tejidos, incluidos el hueso, músculo y nervio, en ese orden.

Recalcaremos el hecho de que los tejidos muy jóvenes o en pleno crecimiento, son más sensibles a la radiación, que los tejidos adultos o inactivos. Ello es importante cuando se trata del establecimiento de límites máximos de exposición.

Otros Factores

Además de a los factores ya discutidos anteriormente, existen otros intrínsecos y extrínsecos, que influyen en el efecto de la radiación. Entre ellos mencionaremos el estado de nutrición; tensión de oxígeno; metabolismo. Conforme se vaya haciendo más investigación sobre este particular, se irán descubriendo muchos otros factores. (24).

EFFECTOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE A NIVEL CELULAR

El principal efecto es la inducción de muerte celular por apoptosis debido a daños en el DNA, inhibición de la proliferación y alteración en la expresión de genes de diversas proteínas y marcadores de membrana; la apoptosis es mediada principalmente por p53.

La sensibilidad celular a la apoptosis se relaciona con factores como:

- La capacidad de reparación del DNA.
- La presencia y funcionalidad del inhibidor de la ciclina quinasa p21. Este es un mediador de la apoptosis que induce el paro del ciclo celular en G1. Se aumenta por el supresor tumoral p53.
- La expresión del gen c-fos aumenta la sensibilidad a la apoptosis en linfocitos T CD4+ y CD8+. Es inducido por la radiación.

Otros efectos celulares de la radiación ionizante son:

- Daños citogenéticos subletales sin apoptosis.
- Inducción de la expresión de CD69 en linfocitos T y B, dependiente de la dosis y el tiempo. Es un marcador de la respuesta a la irradiación.
- Efecto antiproliferativo. Se ha demostrado disminución de la capacidad proliferativa de los linfocitos, conservando el número y capacidad fagocítica de los monocitos.
- Inducción de la activación celular con mayor expresión del factor de transcripción nuclear NFkB en las células T.
- Activación de mecanismos de reparación de los daños cromosómicos subletales.

Cambio en la producción de citoquinas. Bajas dosis de radiación, 0.1 a 6Gy, incrementan la producción de TNF por los macrófagos.(25)

EFFECTOS CLINICAMENTE OBSERVADOS

Efectos Agudos

"Enfermedad de las Radiaciones", es un término empleado para indicar el síntoma complejo que ocurre en pacientes sometidos a terapia por radiaciones. Sus características incluyen náuseas, vómitos, anorexia, pérdida de peso, fiebres y hemorragias intestinales, siendo generalmente más severas estas manifestaciones, después de haberse irradiado el abdomen.

"*Síndrome agudo de Radiación*", es aquel síntoma complejo que ocurre por exposición del cuerpo entero o una gran porción del mismo, a una elevada dosis de radiación, en corto tiempo.

La respuesta sistemática del individuo expuesto a la radiación, se debe: (1) a la expulsión de productos tóxicos, por los tejidos lesionados, y (2) por alteración de la función del órgano debido más directamente a la radiación. En este último grupo podemos incluir (a) cese de formación de granulocitos (glóbulos blancos) por la médula ósea, y (b) ruptura de la barrera intestinal, por lesión epitelial.

Los factores secundarios de respuesta sistemática a la lesión del órgano, son: invasión bacteriana; deshidratación y desnutrición. Sus resultados son: la destrucción extensiva del tejido a través del cuerpo.

Si un individuo se recupera de los efectos agudos de la radiación, varios efectos a largo plazo pueden manifestarse en un tiempo posterior.

Efectos a Largo Plazo

Los efectos a largo plazo, pueden resultar de exposiciones. agudas o prolongadas. *Carcinogénesis*. Por alguna razón no comprendida todavía, la exposición a las radiaciones aumenta en el hombre la incidencia de ciertos tipos de cáncer. La primera evidencia de esta manifestación fue la aparición de cáncer de la piel en la zona quemada repetidamente por rayos-X

El mecanismo de esta acción no está muy claro todavía, aun cuando se han adelantado ciertas hipótesis al respecto. No se ha establecido todavía la existencia de un umbral para esta clase de fenómeno.

Acortamiento del Tiempo de Vida. Gran cantidad de estudios en animales han establecido que la exposición a las radiaciones produce una aceleración del

proceso de envejecimiento, dando como resultado un acortamiento, no especificado, del tiempo de vida. Este efecto es completamente distinto a la aparición de una enfermedad cualquiera; el animal simplemente envejece más rápidamente y muere antes de tiempo, por causas indistinguibles de las que mueren los animales no irradiados. Evidencias recientes de la literatura sugieren que este efecto puede estar ocurriendo en el hombre. Los datos en animales muestran en promedio, un acortamiento del tiempo de vida cercano al 7% por cada 1.000 R. de dosis total de radiación, sin haberse encontrado algún umbral aparente. En contraste a otros efectos de radiación, este fenómeno parece ser cuantitativamente independiente de las especies.

Producción de Mutaciones Genéticas. En 1927, Muller informó que la exposición a las radiaciones aumentaba la proporción de mutaciones genéticas en la mosca de la fruta. Su trabajo ha sido confirmado en otras especies. Recientemente los Russell en Oak Ridge han demostrado que este efecto mutagénico, para una dosis dada de radiación, parece ser 10 veces mayor en el ratón que en la mosca de la fruta. Las mutaciones genéticas han aparecido desde que comenzó la vida en este planeta; el proceso de evolución ocurrió a través de las mutaciones genéticas y de la selección natural. Cuando esta última ocurre sin interferencias, las mutaciones no deseadas (que constituyen la mayoría), tienden a desaparecer gradualmente, mientras que las deseables tienden a incrementarse a través del tiempo. Hoy día, sin embargo, en la especie humana la selección natural no está desarrollándose en forma descontrolada. La civilización ha propendido a la reducción de la selección natural conservando las mutaciones no deseables que ocurren. Actualmente, en el hombre puede resultar un aumento en la proporción de mutaciones genéticas al incrementarse la carga de mutaciones no deseables, reduciéndose de este modo la idoneidad biológica de la especie. Ha quedado bien reconocida la evidencia de que no existe umbral para los efectos genéticos de la radiación. Cualquier dosis de radiación está acompañada de mutaciones y la

cantidad producida es proporcional a la dosis. Por eso, en término de efectos genéticos, no hay dosis segura de tolerancia a la radiación.

Efectos Embriológicos y del Desarrollo. Estrechamente relacionados con los efectos genéticos, existen ciertos cambios embriológicos y del desarrollo que ocurren como resultado de una exposición directa del gameto, cigoto u organismo en desarrollo, o de una exposición de la madre grávida sin haber se expuesto directamente al feto. Se ha determinado en numerosas ocasiones, que las dosis terapéuticas de radiación recibidas por una mujer grávida, puede producir la muerte del feto o dar como resultado, el nacimiento de un niño anormal. Trabajos recientes de laboratorio, en animales, indican que puede lograrse una gama de anormalidades que van desde las difícilmente detectables, a las evidentes y extensivas. En general, cualquier feto de edad superior al período de gestación de seis semanas, parece ser mucho menos sensible. El grado de anormalidad varía directamente con la dosis y el tiempo de exposición. No se ha establecido todavía en forma definida, la existencia de una dosis umbral, necesaria para lograr estos efectos en el desarrollo.(26)

5.3.1 RADIOTERAPIA EN CÁNCER DE SENO

La radioterapia en cáncer de seno muchas veces también afecta a células normales, y esa es la razón por la cual hay mujeres que tienen efectos secundarios como rubor, sequedad, y comezón. Afortunadamente, los efectos secundarios son temporales, y las células normales empiezan a repararse solas aproximadamente 2 horas después de radioterapia. La dosis y duración dependen en la etapa del cáncer, y en que también respondió el tumor a los primeros tratamientos. La radioterapia asimismo es un tratamiento local, por eso solo afecta principalmente las partes del cuerpo donde se encuentra el tumor. Hay dos maneras de administrar la radioterapia: externamente e internamente.

- En la radioterapia externa, rayos de alta energía se difunden al área cancerosa en diferentes ángulos. El propósito de este tratamiento es de irradiar al tumor lo mas posible, sin afectar es tejido de células normales que lo rodean.
- En la radioterapia interna, materiales radioactivos se ponen en tubos delgados de plástico y se implantan directamente en el tumor.

La radioterapia normalmente se administra después de lumpectomías, y los tratamientos se dan 5 días a la semana por 5 o 6 semanas (27).

Estadio I

La radioterapia se aplica después de una resección amplia por mastectomía segmentaria o cuadrantectomía, el seno es irradiado con puertan tangenciales medial y lateral.

- a) El margen superior del campo debe estar en el borde inferior de la cabeza de la clavícula, para incluir todo el seno.
- b) El margen mediano debe estar sobre la línea media.
- c) El margen posterolateral debe estar localizado 2 cm atrás del seno palpable, que usualmente corresponde a la línea axilar media.
- d) El margen inferior debe estar localizado entre 1-2 cm del surco inframamario (submamario).
- e) Cuando se combinan los campos tangenciales con el supraclavicular, el margen superior de los campos tangenciales se localiza en el segundo espacio intercostal (ángulo de Louis).
- f) Se utilizan energía de megavoltaje: Co60 y acelerador de 6, 10,15, o 18 MeVs.
- g) La dosis administrada varía desde 46,8Gys hasta 50,4Gys, dadas a dosis de 1,8-2Gys diariamente, 5 veces por semana.
- h) Se puede utilizar sobredosis al lecho tumoral, la cual puede variar entre 10 y 20Gys, dependiendo del tamaño y el estado de los márgenes de resección; la sobredosis se puede realizar con electrones, fotones con braquiterapia o rayos X.

i) Se irradian axila y fosa supraclavicular en pacientes seleccionadas, como en las que la patología demuestra 4 o más ganglios axilares metastásicos, ganglios mayores de 2,5 cm, compromiso del vértice de la axila o extensión tumoral extracapsular, así reciban tratamiento adyuvante con quimioterapia.

j) En pacientes con estado I y II de seno, carcinoma ductal infiltrante menor de 3 cm en su dimensión máxima, con márgenes de resección quirúrgica mayor de 2 mm libres de tumor, con disección axilar I y II con ganglios clínicamente negativos para tumor, sin microcalcificaciones residuales en el seno, sin evidencia de componente intraductal extenso y edad mayor de 35 años, se puede utilizar braquiterapia de alta tasa de dosis 400cGys por fracción, 8 fracciones con intervalo de 6 horas 2 veces al día para un total de 3.200cGys.

Las pacientes que no van a recibir quimioterapia después de cirugía deben iniciar radioterapia dentro de las siguientes 6 semanas del postoperatorio. Se recomienda un lapso no mayor de 16 semanas para aquellas pacientes que reciben tratamiento adyuvante con quimioterapia.

Los efectos agudos y tardíos de la irradiación se incrementan en las pacientes con enfermedades del colágeno. Se recomienda en los casos en que estas pacientes sean seleccionadas a recibir RT, una dosis de 45Gy, utilizar acelerador de 6MeVs, para optimizar la homogeneidad de la distribución de dosis. Se debe evitar la administración de QT y RT concomitantes, para evitar complicaciones.

Estadio II

Está indicada siempre que se practique cirugía conservadora y en pacientes sometidas a tratamiento quirúrgico radical, con factores pronósticos adversos (Ver radioterapia Estado I y III).

Estadio III

Pacientes con cáncer de seno localmente avanzado T3 y T4, pacientes con tumores técnicamente inoperables y/o que no han respondido a la quimioterapia deben irradiarse a nivel de seno, fosa supraclavicular y región axilar. Se utiliza fraccionamientos entre 180 y 200cGys por día, 5 veces por semana, hasta una dosis de 4.000 a 5.000cGys. Se puede utilizar sobredosis al lecho del tumor, de acuerdo a la respuesta clínica.

□ Radioterapia post operatoria: Se irradian pared torácica, axila y fosa supraclavicular, fraccionamiento, entre 180 y 200cGys/día, 5 veces por semana, hasta una dosis entre 4.000 y 5.000cGys.

□ Radioterapia en cáncer de seno localmente avanzado, con preservación del seno. Es una opción para pacientes que responden significativamente a la quimioterapia neoadyuvante y posteriormente se practica cirugía conservadora. Se utilizan campos tangenciales y axilo-supraclaviculares, en fraccionamientos entre 180 a 200cGys diarios, 5 veces por semana, hasta una dosis entre 4.000 y 5000cGys. Se puede utilizar refuerzo al nivel de lecho tumoral entre 1.000 a 2.000cGys.

□ Se recomienda radioterapia postoperatoria para lesiones mayores de 5 cm de diámetro, con compromiso de piel, fascia o músculo, tumores pobremente diferenciados, márgenes positivos quirúrgicos o muy cercanos, permeación linfática, 4 o más ganglios linfáticos axilares positivos, conglomerado ganglionar o compromiso extracapsular ganglionar.

Estadio IV

Esta indicada en el manejo local regional de aquellos estados IV por fosa supraclavicular o por edema de la piel que exhiben respuesta a la quimioterapia, son tratados como los T3 y T4. En las pacientes con pobre o ninguna respuesta, la intención de tratamiento será paliativa y la dosis será de 3000 cGy. Se hará

electiva la paliación con dosis única de 1000cGy, de acuerdo al estado general y pronóstico de la paciente (28).

5.3.3 RADIOTERAPIA EN CARCINOMA LARINGEO

La radioterapia como tratamiento de primera línea está indicada en las siguientes situaciones:

1. Tumor confinado a la glotis (T1), sin compromiso ganglionar.
2. Tumores supraglóticos (T1), sin compromiso ganglionar.
3. Tumores de la subglotis (T1), sin compromiso ganglionar.
4. Cuando la cirugía está contraindicada por problemas médicos o porque el paciente la rehusa.
5. Como tratamiento paliativo

Técnicas de tratamiento

El uso del megavoltaje ha mejorado notablemente la supervivencia. Los beneficios reales incluyen la protección de la piel, la disminución de "la penumbra", mejor colimación y falta de absorción preferencial de la irradiación por el cartílago. También ha mejorado la homogeneidad de la distribución de la dosis en el volumen tratado.

Inmovilización

El paciente debe estar en posición supina, con el cuello extendido y colocado en esta posición en un aditamento especial. La buena posición del cuello es crucial durante el tratamiento y por ello debe utilizarse un inmovilizador especialmente diseñado para este efecto.

Campos de irradiación

La dirección del haz es muy importante. Debe tener una angulación de cerca de 90° con el fin de lograr una dosis homogénea en el volumen tratado. En caso de tumores glóticos (T1), los dos campos anteriores oblicuos deben utilizarse con filtros de cuña incorporados. El campo debe incluir la comisura anterior.

Cuando se requiera tratamiento para tumores glóticos T2 y T3, e igualmente para tumores subglóticos, y supraglóticos, ambos lados del cuello deben irradiarse, de manera que se incluya el drenaje linfático. Esto se obtiene mediante el uso de dos campos paralelos opuestos, utilizando compensadores o filtros apropiados, a fin de corregir la superficie irregular del área tratada.

Para determinar el tamaño del campo es importante la localización adecuada de la lesión y las radiografías localizadoras son indispensables.

INDICACIONES PARA RADIOTERAPIA POSTOPERATORIA

- Márgenes quirúrgicos positivos o cercanos al borde de resección
- Lesión primaria con extensión a tejidos blandos del cuello
- Invasión del cartílago tiroideo
- Invasión perineural
- Más de un ganglio comprometido por tumor o extensión extracapsular
- Extensión subglótica mayor de 1 cm
- Margen traqueal positivo

TÉCNICAS DE RADIOTERAPIA

Energía

Se utilizan energías de Co60 y acelerador lineal de 4 y 6 MeV.

Volumen blanco

Volumen blanco inicial

- T1 N0: Laringe, ganglios linfáticos subdigástricos, yugulares medios
 - T2-3 N0: Laringe ganglios linfáticos subdigástricos, yugulares medios e inferiores
 - T3-4: Con ganglios linfáticos positivos (tumores avanzados), laringe y todos los ganglios linfáticos cervicales.
 - Dosis adicional al tumor primario y a los ganglios linfáticos comprometidos.
- Diseño de campos
- Posición supina e inmovilización del paciente
 - Campos paralelos opuestos para la lesión primaria y ganglios linfáticos del cuello superior.
 - Límite superior: 2 cm por encima del ángulo de la mandíbula sí el cuello es N0, y 1 cm por encima de la mastoides si el cuello es positivo.
 - Límite inferior: borde inferior de C5, o cartílago cricoides o 2 cm por debajo de la extensión del tumor.
 - Límite anterior: desbordando piel.
 - Límite posterior: detrás del proceso espinoso.

Se usa campo anterior para tratar la región inferior del cuello.

Dosis adicional: campos paralelos reducidos, a la lesión primaria y ganglios linfáticos

comprometidos, con exclusión de la medula espinal.

Se usan electrones para los ganglios linfáticos cervicales posteriores que estén sobre

la medula espinal.

Volumen blanco

- Volumen blanco inicial: lecho quirúrgico, ganglios linfáticos cervicales, traqueostoma.
- Dosis adicional: áreas de enfermedad conocidas

- Diseño de campos: es igual que en los tumores supraglóticos T4, cubriendo adecuadamente el lecho quirúrgico y traqueostoma

Dosis

66-70 Gy al tumor primario y ganglios linfáticos comprometidos, en fraccionamientos

de 1,8 Gy/día, cinco veces a la semana. 45 a 50 Gy a áreas con riesgo enfermedad microscópica, en fraccionamientos de 1,8 Gy/día, cinco veces a la semana. Dosis preoperatoria: 50 a 54 Gy en fraccionamientos de 1,8 Gy/día, cinco veces a la semana. Dosis postoperatoria: 60 Gy cuando hay márgenes negativos, en fraccionamientos de 1,8 Gy/día, cinco veces a la semana; 64 a 66 Gy cuando hay márgenes microscópicamente comprometidos, en fraccionamientos de 1,8 Gy/día, cinco veces a la semana; 70 Gy para márgenes macroscópicamente comprometidos, en fraccionamientos, de 1,8 Gy/día, cinco veces a la semana.

TÉCNICAS DE RADIOTERAPIA

Energías

Cobalto 60, acelerador lineal de 4 a 6 MeV

Volumen blanco

Tumores T1, T2

El tamaño del campo varía de acuerdo con la extensión anatómica del tumor.

Diseño de campos

- El tamaño del campo varía entre 4 x 4 cm hasta 7 x 7 cm
- Límite superior: el borde superior cartílago tiroides
- Límite inferior: el borde inferior del cartílago cricoides
- Límite anterior: desbordando piel

- Límite posterior: margen anterior de los cuerpos vertebrales
- Posición supina
- Campos paralelos opuestos, hasta 50 Gy
- Dosis adicional: si no hay compromiso del tercio posterior de las cuerdas vocales, se reduce el margen posterior 1 cm después de los 50 Gy

Dosis

Para tratamiento radical con intención curativa:

T1 Dosis de 64 a 66 Gy, en fraccionamientos de 1,8-2 Gy/día, cinco veces a la semana

T2 Dosis de 68 a 70 Gy, en fraccionamientos de 1,8-2 Gy/día, cinco veces a la semana

Volumen blanco

Tumores T3, T4 los campos, consideraciones técnicas, dosis y fraccionamiento son

iguales que para los tumores supraglóticos avanzados.

Dosis

Para tratamiento radical con intención curativa: 70-72 Gy, en fraccionamientos de 1,8-

2 Gy/ día, cinco veces a la semana. 45 a 50 Gy a áreas con riesgo de enfermedad microscópica, en fraccionamientos de 1,8 Gy/día, cinco veces a la semana. Dosis postoperatoria: 60 Gy cuando hay márgenes negativos, en fraccionamientos de 1,8Gy/día, cinco veces a la semana; 64 a 66 Gy cuando hay márgenes microscópicamente comprometidos, en fraccionamientos de 1,8 Gy/día, cinco veces a la semana; 70 Gy para márgenes macroscópicamente comprometidos, en fraccionamiento de 1,8 Gy/día, cinco veces a la semana.

En pacientes que rechacen la cirugía o tengan contraindicación a ésta, una opción terapéutica es la radioterapia externa a dosis curativas. Las dosis, así como la técnica de tratamiento y el fraccionamiento, son iguales que para el tumor supraglótico. Para tratamiento radical con intención curativa 70-72 Gy en fraccionamientos de 1,8-2 Gy/día, cinco veces a la semana; 45 a 50 Gy a áreas con riesgo de enfermedad macroscópica en fraccionamiento de 1,8 Gy/ día, cinco veces a la semana. Dosis postoperatoria: 60 Gy cuando hay márgenes negativos, en fraccionamientos de 1,8 Gy/día, cinco veces a la semana; 64 a 66Gy cuando hay márgenes microscópicamente comprometidos, en fraccionamientos de 1,8 Gy/día, cinco veces a la semana; 70 Gy para márgenes macroscópicamente comprometidos, en fraccionamientos de 1,8 Gy/día, cinco veces a la semana. (29).

6. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION	DIMENCION	CATEGORIA	NIVEL
Mortalidad celular	Se determina por aquellas células tumorales que después de ser sometidas a irradiación y a coloración, adquieran el colorante en su citoplasma.	Su medición se realizara con un recuento manual de colonias > 50 células mediante observación en el microscopio.	Numero de células muertas.	Intervalo
Cantidad de irradiación ionizante	Es la dosis de irradiación necesaria para inducir apoptosis a las células tumorales en cultivo.	Se aplicara dosis fraccionada de 2Gy durante 2.8 minutos por 5 días	En Gys	Intervalo
Líneas celulares	Cáncer de seno línea celular 1170 y 1595. cáncer de laringe línea celular HEP-2	Se cuentan 3000 celular por cada línea para cultivar	Número de células por línea	Nominal

7. HIPÓTESIS

Los cultivos de líneas celulares de cáncer de seno 1170 y 1595 y cáncer de laringe línea celular HEP-2 tienen una mortalidad total de la población celular tras la exposición a dosis fraccionada de radiación ionizante a los 10Gys.

8. DISEÑO METODOLOGICO

8.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio experimental prospectivo en condiciones controladas que determinará los efectos de la radiación de las células en cultivo de cáncer de seno y laringe.

8.2 POBLACIÓN

Son células que se adquieren a partir de líneas celulares de los respectivos tumores como son cáncer de seno línea celular 1170, 1595 y carcinoma laringeo línea celular HEP-2 que fueron suministradas por el Departamento Biología Experimental del Instituto Nacional de Cancerológica, que posteriormente serán recultivadas para esta investigación.

8.3 MUESTRA

Son las células que se obtuvieron a partir de subcultivos de la población celular de las líneas 1170, 1595 y HEP-2 de cáncer de seno y cáncer de laringe respectivamente. Las cuales fueron descongeladas y puestas a 37°C de las cuales se tomaron 3000 células de cada línea para subcultivo que se realizó en 5 cajas de cultivo mas una caja de control por cada línea celular. Siendo una muestra representativa homogénea adecuada no viciada.

7.3.2 TÉCNICA E INSTRUMENTOS

Por medio de la manipulación de las células se tubo un cultivo viable de las tres líneas celulares y se sometieron a irradiación con una cámara de radioterapia de cobalto y por observación directa con utilización de un microscopio invertido se

observaron los resultados y se registraron en planillas de control para su procesamiento.

7.3.3 PROCEDIMIENTO

La técnica que utilizaremos para el cultivo celular ha sido implementada por el Departamento de Biología Experimental del Instituto Nacional de Cancerológica en dirección de la Dra. Clemencia De Castro y la Dra. Tulia de Murcia.

Las células que se obtuvieron inicialmente estaban bajo congelación en nitrógeno líquido a -50°C , fueron sometidas a un proceso de descongelación en donde las células son llevadas a una temperatura de 37°C al baño María, posteriormente trasportadas a un tubo de ensayo al cual se le adicionaran 5 ml del medio de cultivo, que se dejaron por un espacio de 4 horas a una temperatura de 37°C .

Inmediatamente después se centrifugaron las células a 1200-1500 revoluciones por minuto por 7 minutos, para ello se marcaron previamente los tubos con el número de la línea celular. El sobrenadante se vierte en un nuevo tubo de ensayo para una nueva centrifugada para obtener las células que hallan podido quedar allí.

El sedimento de células se depositó en las cajas de cultivo con medio, Suero Fetal Bovino (SFB), solución antibiótica (2-3 ml de penicilina- estreptomycin o gentamicina) y fungisona; durante un día, se observa que las células estén adheridas si no se vuelve a centrifugar y resembrar.

Para la preparación del medio se utilizó 1 litro de agua destilada, L15 medium, solución antibiótica y cápsula de magneto (agitador). Una vez preparado se envaso y rotuló para refrigerarlo. Cuando se utilizó como primera medida se filtró con jeringa de 5/4 y un filtro de $0.22\mu\text{m}$; como segunda medida se le adiciono suero fetal bovino al 10% (por cada 100ml del medio se adicionan 10ml de SFB).

El volumen requerido del medio compacto (L15 medium + SFB) en las cajas de cultivo pequeñas 3ml.

Las células cultivadas se dejaron un día para adaptación en incubadora a 37°C , posteriormente se desecha el medio de las cajas de cultivo y se les adiciona tripsina 1.5ml para soltar las células, cuando se soltaron se les administró suero fetal bovino para inactivar la acción de la tripsina. Después se les adicionó suero fisiológico para suspender las células que fueron envasadas en tubos de ensayo estériles con tapa que fueron centrifugadas por 5 minutos. Posteriormente se desechó el sobrenadante y se les administro 5ml de medio y se procedió a hacer el conteo total de las células Con el cubreobjetos en la cámara de hemocitometría (cámara de Bawer) se combinaron 10 lambdas de células con 10 Lambdas de la solución Azul de Tripam al 0.4%, usando la micropipeta. de las cuales se obtuvieron 3000 células para el estudio, para tal efecto se empleó la siguiente formula:

$(X).(1000) = (Y). (3000 \text{ n}^\circ \text{ de células a cultivar}) =$ $\sqrt{\Sigma} = N$ <p>X= n° de células contadas</p> <p>N= medio en ml para la dilución de las células a cultivar</p>
--

De la línea celular 1170 se contaron 708 células a las cuales se les aplicó la formula que dio como resultado 13ml de medio al cual se le hicieron 3 diluciones para llevar a 3ml de medio.

De la línea celular 1595 se contaron 244 células a las cuales se les aplicó la formula que dio como resultado 20ml de medio al cual se le hicieron 2 diluciones para llevar a 4.2ml de medio.

De la línea celular HEP-2 se contaron 439 células a las cuales se les aplicó la formula que dio como resultado 27ml de medio al cual se le hicieron 2 diluciones

para llevar a 6.5ml de medio. Se sembraron 6 cajas por línea celular que correspondían a cada dosis de irradiación (2,4,6,8,10Gys y una de control). Se les administró 2Gys diarios por un lapso de 2.8 minutos a todas las cajas excepto los controles.

CUADRO1.Cronograma de Irradiaciones de las Líneas Tumorales 1170,1595 y HEP-2.

	MAYO 19	MAYO 20	MAYO 21	MAYO 22	MAYO 23
1170					
2 Gys	X				
4 Gys	X	X			
6 Gys	X	X	X		
8 Gys	X	X	X	X	
10Gys	X	X	X	X	X
1595					
2 Gys	X				
4 Gys	X	X			
6 Gys	X	X	X		
8 Gys	X	X	X	X	
10Gys	X	X	X	X	X
HEP-2					
2 Gys	X				
4 Gys	X	X			
6 Gys	X	X	X		
8 Gys	X	X	X	X	
10Gys	X	X	X	X	X

Después de irradiado el grupo celular correspondiente se esperaron 14 días y se realizó el conteo celular. Para realizar el conteo se lavaron las cajas de cultivo con

suero fisiológico, se adicionó colorante violeta de genciana y se espero durante 10 minutos para que las células vivas captaran el colorante.

Después se desechó el colorante y se lavaron las cajas nuevamente con suero fisiológico. Seguidamente por medio de un estereoscopio se procedió a contar la totalidad de las colonias y las colonias mayores de 50 células.

7.3.3 PLAN DE TABULACION Y ANALISIS

El conteo de las colonias mayores de 50 células se realizó mediante observación directa en un estereoscopio, para tal fin previamente se demarcó en las cajas de cultivo 6 cuadrantes los cuales facilitaron el recuento de las mismas. Los datos se consignaron en las planillas de control de cada línea celular cuya información fue almacenada. Los datos fueron procesados mediante graficas y tablas con aplicación de formulas matemáticas.

8. RESULTADOS

El cáncer es una de las enfermedades que mas estudios esta impulsando en la actualidad, especialmente en el campo del manejo tanto paliativo como curativo, en donde están los mas grandes retos para los investigadores y además porque es el punto que mas beneficia a los pacientes, ya que es aquí donde podemos brindar una terapia mas racionalizada, que les permita mayor acople a los diversos tratamientos y que pueda minimizar los efectos de los mismos.

Debido a que la radioterapia es uno de los tratamientos mas usados en el manejo del cáncer, es necesario que se determinen dosis adecuadas para ser suministradas a los pacientes, ya que de esta forma se puede atacar mas eficazmente la enfermedad y el paciente podrá ópteme mejores resultados; por ello en esta investigación se busco determinar las dosis en las cuales murieran el 50% de las colonias para poder buscar una optimización de los tratamientos; para esto se trabajaron con líneas celulares HEP-2 de cáncer de laringe, 1170 y 1595 de cáncer de seno, de las que se obtuvieron los siguientes resultados.

Con la línea celular de cáncer de seno 1170 se obtuvieron los siguientes resultados:

Después de cultivar y someter a los células a radiación fraccionada de 2Gys se procedió hacer el conteo de los colonias, para ello se tomo el cultivo celular control de la línea 1170 como el 100% para las colonias existentes y se comparó con los datos obtenidos por las otras cajas de cultivos celulares irradiadas de su respectiva dosis en donde se evidencio por resultados matemáticos que la mortalidad de la mitad de la población celular correspondió a 676 colonias mayores de 50 células, localizándose estas en la caja de cultivo correspondiente a 4Gys para unas 405 colonias mayores de 50 células, determinando esto que la

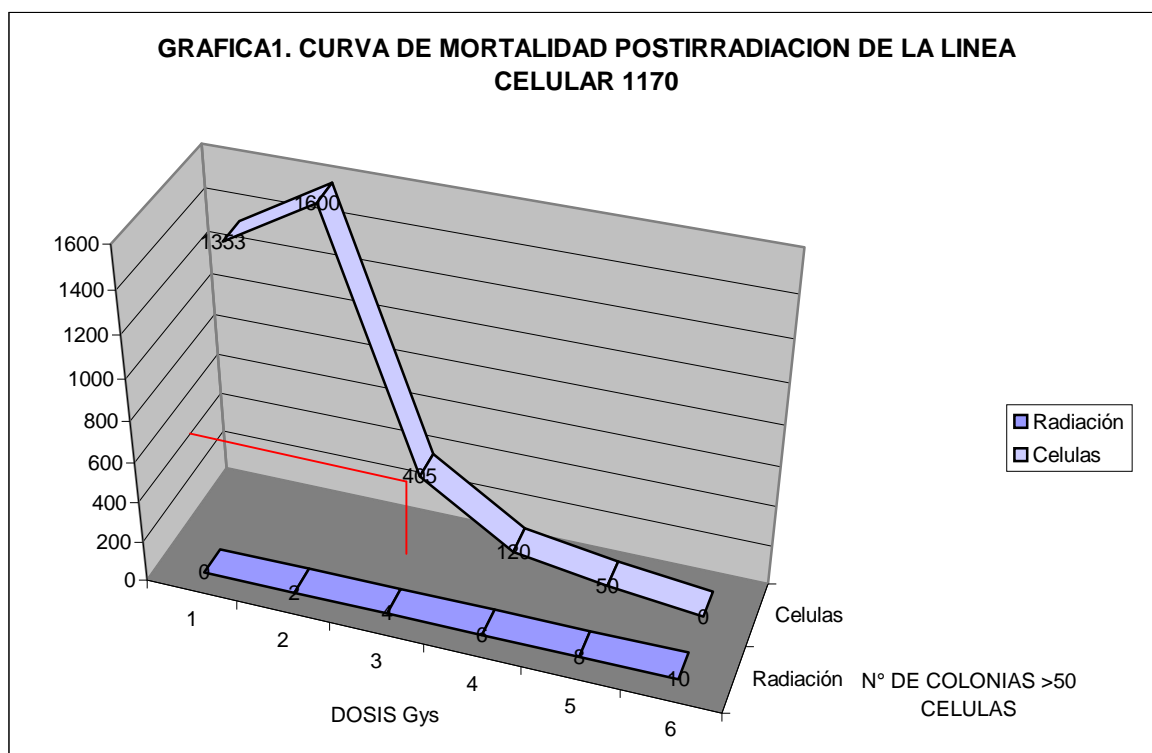
Dosis Letal 50 para la línea celular 1170 de cáncer de seno esta entre 4-6Gys .
(ver cuadro 1)

CUADRO 2. Numero de Colonias mayores de 50 células de la línea 1170 posradiación.

GYS	N° DE COLONIAS MAYORES DE 50 CELULAS
0 (control)	1353
2	1600
4	405
6	120
8	50
10	0

En la línea celular 1170 se observo que en la caja de cultivo correspondiente a 2Gys, el numero de colonias mayores de 50 células fue de 1600, después de la irradiación, lo que nos demuestra ,comparando con el grupo control, que existe un disparo de la mitosis a esta dosis, ocasionado por el aumento de los mecanismos de reparación celular que tienen todas las células sometidas a una injuria.

También se pudo observar, que en la caja de cultivo correspondiente a 10Gys, no se pudo contar ninguna colonia mayor de 50 células, lo que nos indica, comparando con el grupo control, que a 10Gys se genero la muerte de toda la población celular, debido a que a esta dosis fraccionada de irradiación se agotan los mecanismos de reparación de todas las células. (ver grafica 1).



A la línea celular 1595 de cáncer de seno se le realizó el conteo de las colonias mayores de 50 células partiendo de la caja control y seguidamente se contaron las colonias formadas con más de 50 células en las otras cajas sometidas a irradiación fraccionada de 2Gys. (ver cuadro 3).

CUADRO 3. Numero de Colonias mayores de 50 células de la línea 1595 posradiación.

GYS	Nº DE COLONIAS MAYORES DE 50 CELULAS
0 (control)	1092
2	1174
4	658
6	230
8	67

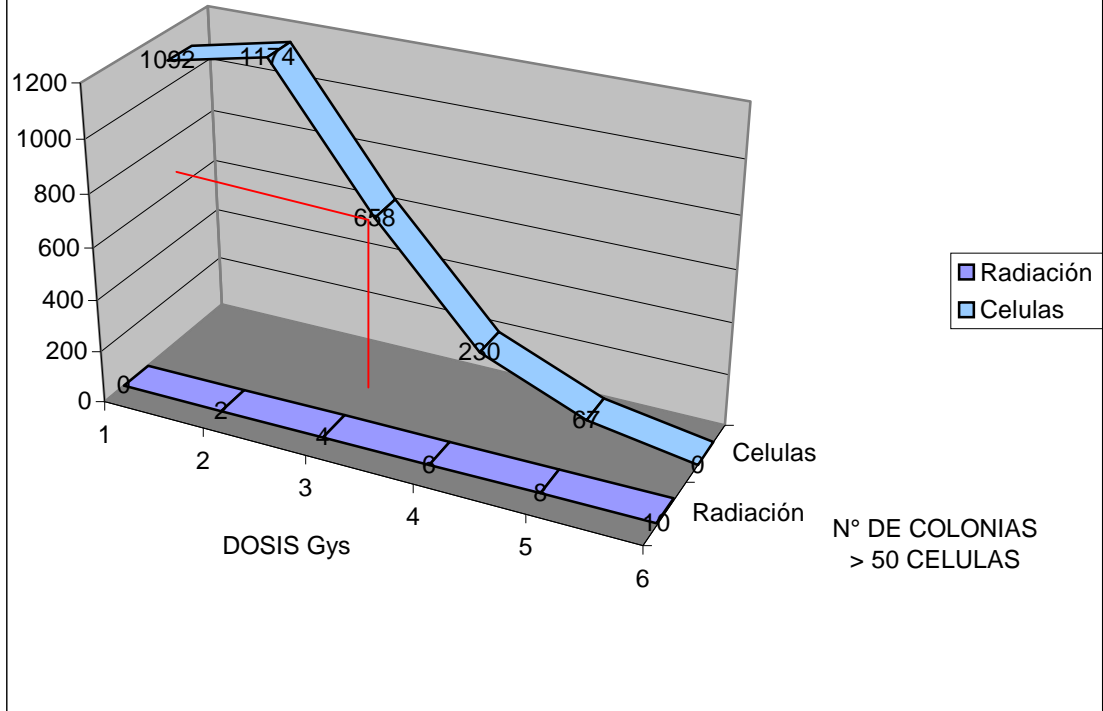
10	0
----	---

Tomando la caja de cultivo celular control de la línea tumoral de seno 1595 como el 100%, la cual no fue sometida a irradiación, se pudo determinar mediante procedimientos matemáticos que la mortalidad de la mitad de la población celular correspondió a 547 colonias mayores de 50 células; que se observó en la caja de cultivo celular que fue sometida a irradiación ionizante fraccionada de 4Gys la cual por conteo se registraron 658 colonias mayores de 50 células; por lo tanto la Dosis Letal 50 de la línea celular 1595 de cáncer de seno se encontró a 4Gys.

En la caja de cultivo celular irradiada a 2Gys se pudo contar 1174 colonias mayores de 50 células, que al ser comparadas con el control de la misma línea celular se evidenció un elevación de la mitosis, fenómeno que se originó por el estímulo que activa los mecanismos de reparación celular, que presentan las células cuando se ven sometidas a fenómenos de agresión.

Además se observó, que en las cajas de cultivo celular con irradiación fraccionada hasta 10Gys, no se pudo contar ninguna colonia mayor de 50 células, que al ser comparada con el grupo control se evidencio que hubo muerte de la totalidad de la población celular sometida a esta dosis, ya que a este nivel, los mecanismos de reparación celular se han agotado por el suministro de la dosis fraccionada y se impide que las células adopten otros medios de progresión tumoral.(ver grafica 2).

GRAFICA 2. CURVA DE MORTALIDAD POSRADIACION DE LA LINEA CELULAR 1595



Al realizar el conteo de las colonias mayores de 50 células de la caja de cultivo celular control de la línea HEP-2 que no fue sometida a irradiación ionizante se observó 1240 colonias, luego se procedió hacer el conteo de las colonias mayores de 50 células de las cajas de los cultivos celulares que fueron sometidas a irradiación ionizante a dosis fraccionadas (ver cuadro 4).

CUADRO 4. Numero de Colonias mayores de 50 células de la línea HEP-2 posradiación.

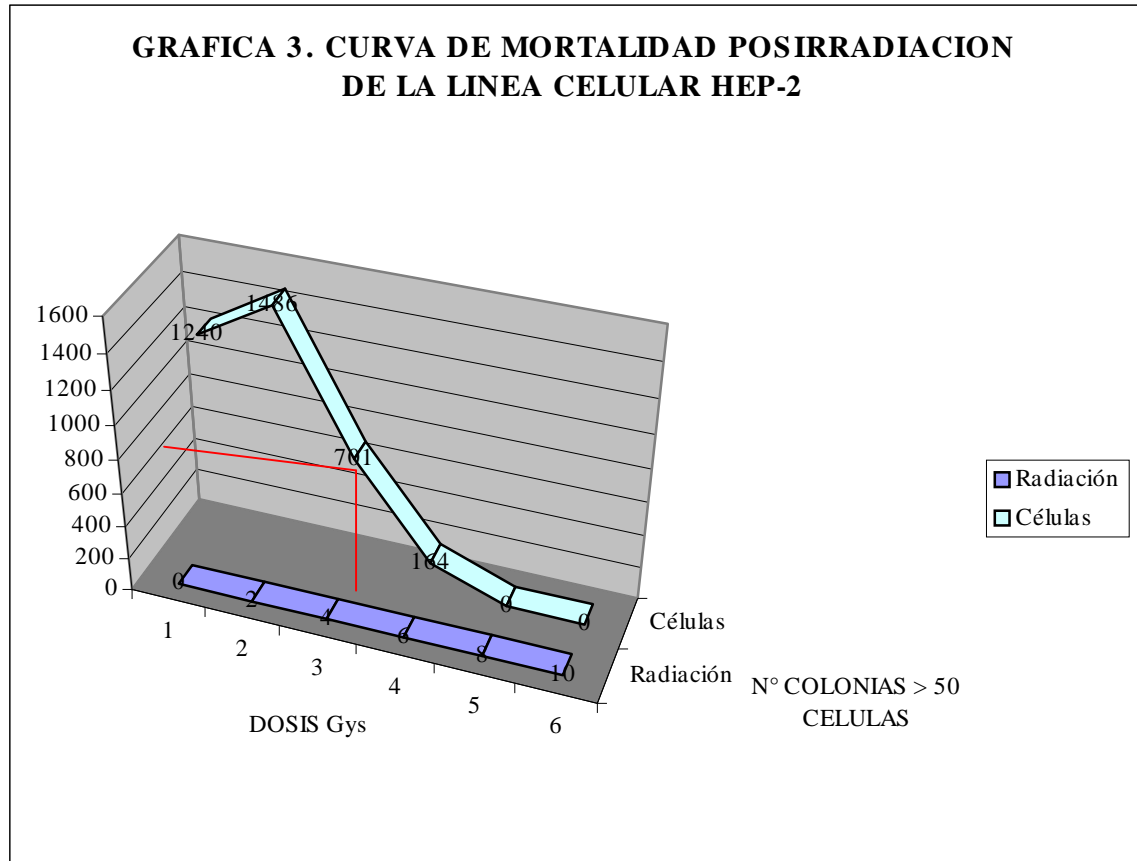
GYS	N° DE COLONIAS MAYORES DE 50 CELULAS
0 (control)	1240
2	1486
4	701
6	164
8	0
10	0

Tomando el cultivo celular control de la línea HEP-2 como el 100% se pudo demostrar mediante cálculos matemáticos que la mortalidad de la mitad de la población celular corresponde a 620 colonias mayores de 50 células que se observó en la caja de cultivo celular que fue sometida a irradiación de 4Gys en donde el número de colonias mayores de 50 células es de 701. Por lo anterior la Dosis Letal 50 para la línea celular HEP-2 de cáncer laríngeo es de 4Gys.

En la caja de cultivo celular de la línea HEP-2 que se irradió con 2Gys el recuento de colonias mayores de 50 células dio 1486 colonias que al ser comparada con el número de colonias de la caja control se observó un aumento de dichas colonias, fenómeno que se presentó debido al estímulo que causa la irradiación ionizante en los mecanismos de reparación celular manifestándose como un aumento de la mitosis en las células.

Además se notó que con una dosis de irradiación fraccionada de 8Gys no se logró contar ninguna colonia mayor de 50 células en la caja de cultivo de la línea celular HEP-2, demostrando que a esta dosis se presenta una mortalidad total de la

población celular causada porque existe un agotamiento de los mecanismos de reparación que existen en las células debido a la injuria que representa la irradiación ionizante en la célula a dosis elevadas. (ver grafica 3).



9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Al irradiar las tres líneas celulares tumorales se evidenció un aumento en el número de colonias a dosis de 2Gys como respuesta al daño subletal que sufren las células lo cual según la teoría es un mecanismo radiobiológico de respuesta a la irradiación en el cual hay una repoblación acelerada manifestada en el aumento del número de divisiones celulares como mecanismo de compensación (30).

En esta investigación se pudo observar además que con las líneas celulares de cáncer de seno 1170 y 1595 se presentó una mortalidad del 50% de las colonias celulares a dosis de 4Gys y observó que se presentó una mortalidad total de la población celular a dosis de 10Gys; teniendo en cuenta que las dosis suministradas fueron fraccionadas a 2Gy diarios. Esto evidencia que las dosis de irradiación encontradas en la investigación son mucho más bajas para el tratamiento de dicho tumor y por lo tanto podrían tener menos efectos colaterales al ser suministradas a los pacientes, a diferencia del tratamiento dado con mayores dosis.

Los protocolos que se tienen en el tratamiento con radioterapia para cáncer de seno establecen dosis que van desde 40 a 50Gys tanto para estadios tempranos como para estadios avanzados que se dosifican fraccionadamente a 1.8-2Gys, para el suministro de las dosis se tiene en cuenta los diversos parámetros de progresión tumoral, tipo histológico y localización del tumor lo que conlleva a variación en las dosis.(31)

Al comparar las dosis establecidas en los protocolos de manejo para cáncer de laringe con los resultados obtenidos en esta investigación se observó que con la línea celular de cáncer de laringe HEP-2 la mortalidad celular del 50% de las colonias se presentó a dosis de 4Gys y la mortalidad celular total se hizo evidente

a 8Gy por lo tanto con estas dosis se podría obtener el efecto deseado de detección de la progresión y muerte celular tumoral a dosis mas bajas lo cual minimizaría la aparición de efectos adversos en los pacientes tratados para tal fin.

En el manejo establecido para el cáncer de laringe con radioterapia se emplean dosis totales que varían entre 45 a 72Gys según el estadio tumoral y las intenciones curativas o paliativas del tratamiento. Estas dosis son suministradas fraccionadamente a 1.8-2Gys diarios 5 veces por semana.(32)

Al tener en cuenta que las dosis de irradiación se suministraron en forma fraccionada se pudo encontrar en esta investigación que a 4Gys se obtiene una buena respuesta en cuanto a la mortalidad del 50% de la población celular, ya que la teoría expone que tras una fracción de radiación se sitúan más células en fase G2 y M siendo más radiosensibles ante las siguientes fracciones y la reoxigenación va a ser mayor ósea durante el tratamiento existen células hipoxicas que al final del tratamiento estarán oxigenadas y serán radiosensibles, y el tejido normal va a poder reparar el daño subletal en los intervalos entre fracciones. En contra, si el tiempo global de tratamiento es muy largo, se va a permitir que las células tumorales proliferen (repoblación acelerada) durante el tratamiento, influyendo negativamente en el control tumoral. Habrá que tener en mente todos estos fenómenos para encontrar la dosis por fracción y tiempo de tratamiento óptimos en cada tratamiento(33).

10.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- En esta investigación se pudo determinar que la Dosis Letal 50 para las líneas celulares de cáncer de seno 1170 y 1595 es de 4Gys.
- Se observó en las líneas celulares de cáncer de seno 1170 y 1595 que la mortalidad total de la población celular se encuentra a la dosis de 10Gys.
- En la línea celular de cáncer de laringe HEP-2 se evidenció que su Dosis Letal 50 se encuentra a 4Gys.
- La mortalidad de la totalidad de la población celular de la línea HEP-2 se halló a 8Gys.
- A bajas dosis de irradiación (2Gys) se disparan los mecanismos de reparación celular haciéndose evidente con el aumento de mitosis que eleva el número de colonias de las líneas celulares investigadas.
- A dosis mas altas, 8Gys para la línea celular HEP-2 y 10Gys para las líneas celulares 1170 y 1595; se agotan los mecanismos de defensa celular desencadenando apoptosis.
- A partir de 4-6Gys las células pierden su capacidad de división después de ser tratadas con radiación ionizante que se observó con la disminución progresiva de la formación de colonias celulares.
- Se recomienda que en futuras investigaciones, se tengan en cuenta otras líneas celulares de diversos tumores para que se enriquezca el conocimiento de las dosis exactas y se le pueda brindar una terapia más racionalizada a los pacientes con cáncer.

11. BIBLIOGRAFÍA REFERENCIAL

1. Scheinber, David, Art.: Una radioterapia destruye la célula tumoral desde adentro. Revista Science, Noviembre 17, 2001
2. Luján CPJ, Herrera CW, Gainza LS, García GH, Díaz RL Radioterapia en el melanoma maligno. Experiencia con hipofraccionamiento en el tratamiento de las recurrencias locoregionales *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)* 1997; 43 (3): 142-146.
3. Ministerio de Salud, Guías de Práctica Clínica en Enfermedades Neoplásicas, 2ª edición, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, 2001, pag 79, 299.
4. Barrera-Rodríguez, M Raúl. Salud Publica de México, Bases Moleculares de la Inmunología del Cáncer, julio- agosto 1995, pag 344-353.
5. García Luna, Raúl, Cáncer La Ultima Batalla, Rev. [www. Conozca más.com](http://www.conozca-mas.com)
6. Garbam, Hermes J. Academia Biomédica Digital. Bases Moleculares del cáncer: Oncología molecular, hgarban@ucla.edu
7. Ministerio de Salud, Op. cit, p.79.
8. Fonseca R, Hartmann LC, Petersen IA, et al.: Ductal carcinoma in situ of the breast. *Annals of Internal Medicine* 127(11): 1013-1022, 1997.
9. Ministerio de Salud, Op. cit, p.79-80.
10. Fonseca R, Op. cit, p.1015-1016.
11. Ariel IM, Cleary JB, Eds.: *Breast Cancer - Diagnosis and Treatment*. New York: McGraw-Hill, 1987.
12. Ministerio de Salud, Op. cit, p.88-104.
13. Fisher ER, Costantino J, Fisher B, et al.: Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) Protocol B-17. *Cancer* 78(7): 1403-1416, 1996.
14. Ministerio de Salud, Op. cit, p.291
15. Ibid, p. 291-307.
16. Pollard, Jeffrey W. *Animal cell culture*, 1990

17. Freshney, R. IAN, Culture of Epithelial cell, 1992,p. 120-159.
18. Ibid, p.125-126
19. KRUSE, P.F. Jr. & PATTERSON, M.K. Jr., 1973, Tissue Culture Methods and Applications, Academic Press, New York, London.
20. ADAMS, R.L.P., 1990, Laboratory Techniques in Biochemistry and Biology.Cell Culture for Biochemists, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
21. PARKER, R.C. & PAUL, B., 1961, Methods of Tissue Culture, Hoeber, Inc. Medical Div. of Harper & Brothers.
22. Tubiana Maurice, Dutreix Jean, Wambersie Andre, Introduction to Radiobiology, Editorial Taylor & Francis, 1990, Pag 86-125
23. Biological Effects of Atomic Radiation -summary reports (Efectos Biológicos Dé la Radiación Atómica-Informes Sumarioris). Washington, D.C.: National Acaderny of Sciences-National Research Council. 1960.
24. Hollaender, Alexander. Radiation Bíology. New York: Megraw-Hill Book Co., Ine. 1954-1956.
25. Some Effects of Ionizaing Radiation on Hit-man Beings. Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office.
26. Pathologie Effects of Atomic Radiation. Washington, D.C.: Federal Radiation Council. 1962.
27. Fisher B, Costantino J, Redmond C, et al.: Lumpectomy compared with lumpectomy and radiation therapy for the treatment of intraductal breast cancer. New England Journal of Medicine 328(22): 1581-1586, 1993.
28. Ministerio de Salud, Op. cit, p.301
29. Ibid, p.303.
30. Lester J. Peters, William A. Bock, Elizabeth L. Travis. Radiobiología aplicada al fraccionamiento con trascendencia clínica. Avances en Oncología, 1990. Pág: 87-105.
31. Ministerio de Salud, Op. cit, p100-104
32. Ibid, p.305-307

33. Damian Guirado Llorente: relaciones dosis- tiempo- fraccionamiento en radioterapia. Isoefecto. VI Curso sobre radiobiología clínica. Granada, febrero de 2000.

12. BIBLIOGRAFIA GENERAL

1. Patchefsky AS, Schwartz GF, Finkelstein SD, et al.: Heterogeneity of intraductal carcinoma of the breast. *Cancer* 63(4): 731-741, 1989.
2. Solin LJ, Fourquet A, McCormick B, et al.: Salvage treatment for local recurrence following breast-conserving surgery and definitive irradiation for ductal carcinoma in situ (intraductal carcinoma) of the breast. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 30(1): 3-9, 1994.
3. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, et al.: Lumpectomy and radiation therapy for the treatment of intraductal breast cancer: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-17. *Journal of Clinical Oncology* 16(2): 441-452, 1998.
4. Amichetti M, Caffo O, Richetti A, et al.: Ten-year results of treatment of ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast with conservative surgery and radiotherapy. *European Journal of Cancer* 33(10): 1559-1565, 1997.
5. Fisher ER, Costantino J, Fisher B, et al.: Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) protocol B-17. *Cancer* 75(6): 1310-1319, 1995.
6. Page DL, Lagios MD: Pathologic analysis of the National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) B-17 trial: unanswered questions remaining unanswered considering current concepts of ductal carcinoma in situ. *Cancer* 75(6): 1219-1222, 1995.
7. Fisher ER, Costantino J, Fisher B, et al.: Response - blunting the counterpoint. *Cancer* 75(6): 1223-1227, 1995.
8. Silverstein MJ, Poller DN, Waisman JR, et al.: Prognostic classification of breast ductal carcinoma-in-situ. *Lancet* 345(8958): 1154-1157, 1995.
9. Silverstein MJ, Gierson ED, Colburn WJ, et al.: Axillary lymphadenectomy for intraductal carcinoma of the breast. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* 172(3): 211-214, 1991.

10. Karlsson P, Holmberg E, Samuelsson A, et al.: Soft tissue sarcoma after treatment for breast cancer--a Swedish population-based study. *European Journal of Cancer* 34(13): 2068-2075, 1998.
17. Boice JD, Harvey EB, Blettner M, et al.: Cancer in the contralateral breast after radiotherapy for breast cancer. *New England Journal of Medicine* 326(12): 781-785, 1992.
11. Fraass BA, Roberson PL, Lichter AS: Dose to the contralateral breast due to primary breast irradiation. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 11(3): 485-497, 1985.
12. Frykberg ER, Santiago F, Betsill WL, et al.: Lobular carcinoma in situ of the breast. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* 164(3): 285-301, 1987.
13. Ciatto S, Cataliotti L, Cardona G, et al.: Risk of infiltrating breast cancer subsequent to lobular carcinoma in situ. *Tumori* 78(4): 244-246, 1992.
14. Feller WF, Holt R, Spear S, et al.: Modified radical mastectomy with immediate breast reconstruction. *American Surgeon* 52(3): 129-133, 1986.
15. Kuske RR, Schuster R, Klein E, et al.: Radiotherapy and breast reconstruction: clinical results and dosimetry. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 21(2): 339-346, 1991.
16. Stotter AT, McNeese M, Oswald MJ, et al.: The role of limited surgery with irradiation in primary treatment of ductal in situ breast cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 18(2): 283-287, 1990.
17. Bornstein BA, Recht A, Connolly JL, et al.: Results of treating ductal carcinoma in situ of the breast with conservative surgery and radiation therapy. *Cancer* 67(7): 7-13, 1991.
18. Orel SG, Troupin RH, Patterson EA, et al.: Breast cancer recurrence after lumpectomy and irradiation: role of mammography in detection. *Radiology* 183(1): 201-206, 1992.
19. Andrews, G. A., Brucer, y Anderson, E. B. (Editores). *Radioisotopes in Medicine (Radioisótopos en Medicina ')*, ORO 125. Washington, D.C.: Government Printin.- Office. 1955.

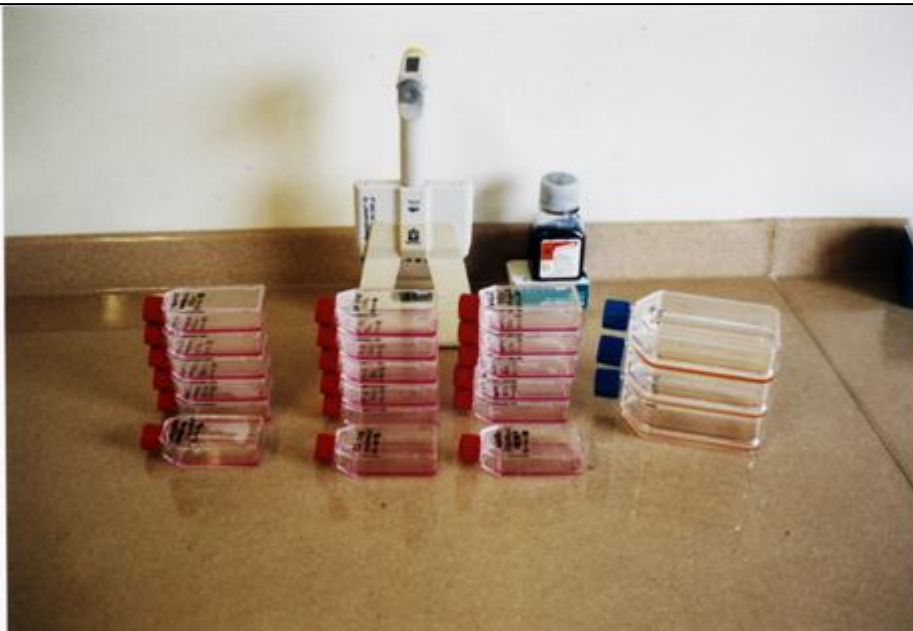
20. Behrens, G. F. Atomic Medicine. 2nd Ed.; Baltimore: Williams & Wilkins Co. 1953.
21. Blair, H. A. Data Pertaining to Shortening of Life Span by Ionizing Radiation AEC Document UR-442. Washington, D.C.: U.S. Atomic Energy Comm. 1956.
22. Brues, Austin M. Radiations as a Carcinogenic Agent. Radiation Research, Vol. III, No. 3, November 1955.
23. Glasser, Otto G. Medical Physics. Chicago: Year Book Medical Publishers, Inc. Vol. I, 1944; Vol. II, 1950.
24. Glasser, Otto G., et al. Physical Foundations of Radiology. 2nd Ed.; New York: P. B. Hoeber. 1952.
25. Muller, H. J. How Radiation Changes the Genetic Constitution (Cómo la Radiación cambia la Constitución Genética). Bulletin of the Atomic Scientists, Vol. 11, No. 9, Nov., 1955.
26. Muller, H. J. The Manner of Dependence of the Permissible Dose of Radiation on the Amount of Genetic Damage (La forma de Dependencia de la Dosis Permissible de Radiación en la Extensión del Daño Genético). Acta Radiologica, Vol. 41, Jan. 1954;
27. Devita, Vicent, Cáncer Principles and practice of oncology, 6 edición 2001, p. 1633-1721.
28. Von Hoff D, Forseth B, Gonzalez L, Culture and Sensibility Testing of tumors Cancer update vol 82, 1986
29. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, et col. Feasibility of a high-flux anticancer drug screening using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. Journal of the National Cancer Institute. Vol 83, 1991
30. Salmons, E, Hamburger AW, Soehnlen B, Brain BS, Durie GM, Alberts DS. And Moon TE. Quantitation of Differential Sensitivity of Human- Tumor Stem Cells to Anticancer Drugs. The New England of Medicine. Vol 1298. 1978

ANEXOS

ANEXO A .Fotografía. Subcultivo de las líneas celulares tumorales de seno y laringe



ANEXO B. Fotografía. Cajas de cultivo celular de las líneas 1170, 1595 y HEP-2



ANEXO C. Fotografía. Incubación de líneas celulares seno y laringe



ANEXO D. Fotografía. Cámara de irradiación de cobalto



ANEXO E. Fotografía.
Observación de líneas
celulares posradiación



ANEXO F. Fotografía.
Conteo de colonias





ANEXO G. Colonias con coloración posradiación

