

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS**

**Máster en Física Biomédica**



**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

Caracterización del campo de irradiación del Gammacell<sup>®</sup> 1000 Elite y su impacto en ensayos biológicos

Characterization of the irradiation field of the Gammacell<sup>®</sup> 1000 Elite and Its impact on biological assays

**Laura García-Arias Tajuelo**

Tutores:

Daniel Sánchez Parcerisa (Fac. CC. Físicas)

Álvaro Gutiérrez Uzquiza (Fac. Farmacia)

Curso académico 2023-2024

*Dedicado a la única persona que no se lo puedo agradecer en persona.  
Porque siempre has estado conmigo y todavía sigues aquí, gracias.  
Te quiero mucho Criti.*

## Resumen:

Para realizar estudios de radiobiología con el irradiador de  $^{137}\text{Cs}$  Gammacell® 1000 Elite de la Instalación Radiactiva Central de la UCM, es necesario caracterizar el campo de radiación para tener una dosimetría precisa sobre las muestras. En este trabajo se describen tres experimentos sucesivos donde se completa esta caracterización. En el primer proyecto se realizó una irradiación controlada con películas radiocrómicas (RC) con el fin de obtener la distribución espacial de dosis en aire del campo de irradiación. Se irradiaron películas EBT4 con dosis entre 0-12 Gy y se analizaron posteriormente mediante *scripts* de MATLAB. Este estudio permitió caracterizar la inhomogeneidad vertical del campo de irradiación, estableciendo un límite a una altura de  $4,50 \pm 0,17$  cm por debajo de la cual la inhomogeneidad es superior al 7 % (y por tanto es desaconsejable su uso), mientras que la región superior tiene una homogeneidad mayor al 98 %. También se caracterizó la variación de dosis radial debida a la mayor proximidad a la fuente, estimada en un aumento del 5 % de la dosis por cada centímetro desplazado en dirección radial. Finalmente, se obtuvo un valor preciso de la tasa de dosis en la zona central ( $\dot{Q} = 0,11228 \pm 0,00080$  Gy/s), caracterizando también la dosis extra recibida por las muestras durante el tiempo de posicionamiento. Con todos estos parámetros se obtuvo una expresión analítica que describe el campo de radiación en todo el espacio de interés. En el segundo experimento se midió el apantallamiento de los tubos que se utilizan para contener las muestras biológicas. Utilizando la descripción del campo de irradiación, y a partir de una irradiación controlada de RC EBT3, se determinó que los tubos Eppendorf utilizados en la mayoría de experimentos absorben un 10 % de la radiación incidente. Finalmente, para validar lo obtenido, se realizó un ensayo biológico con la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Tubos con células de esta línea fueron irradiados en distintas posiciones del campo de radiación para estudiar su supervivencia mediante un ensayo clonogénico, así como su transición a un estado de senescencia. Ambos estudios resultaron coherentes con la descripción del campo de radiación permitiendo determinar parámetros radiobiológicos experimentales coherentes con la literatura.

## Abstract:

To carry out radiobiology studies with the  $^{137}\text{Cs}$  Gammacell® 1000 Elite irradiator of the UCM Central Radioactive Facility, it is necessary to characterize the radiation field to have accurate dosimetry on the samples. In this work three successive experiments are performed where this characterization is fulfilled. In the first project, controlled irradiation with radiochromic films (RC) was carried out in order to obtain the spatial distribution of doses in air of the irradiation field. EBT4 films were irradiated with doses between 0-12 Gy and subsequently analyzed using MATLAB scripts. This study allowed us to characterize the vertical inhomogeneity of the irradiation field, establishing a limit at a height of  $4,50 \pm 0,17$  cm below which the inhomogeneity is greater than 7 % (and therefore its use is inadvisable), while the upper region has a homogeneity greater than 98 %. The variation in radial dose due to greater proximity to the source was also characterized, estimated at a 5 % increase in the dose for each centimeter displaced in the radial direction. Finally, a precise value of the dose rate in the central zone ( $\dot{Q} = 0,11228 \pm 0,00080$  Gy/s) was obtained, also characterizing the extra dose received by the samples during positioning time. With all these parameters, an analytical expression was obtained that describes the radiation field throughout the space of interest. In the second experiment, the shielding of the tubes used to contain the biological samples was measured. Using the description of the irradiation field, and from a controlled irradiation of RC EBT3, it was determined that the Eppendorf tubes used in most experiments absorb 10 % of the incident radiation. Finally, to validate the results, a biological assay was carried out with the breast cancer cell line MDA-MB-231. Tubes with those cells were irradiated in several positions of the radiation field to study their survival through a clonogenic assay, as well as their transition to a state of senescence. Both studies were consistent with the description of the radiation field allowing experimental radiobiological values consistent with the literature.

# Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Introducción</b>                                   | <b>2</b>  |
| <b>2. Objetivos</b>                                      | <b>4</b>  |
| <b>3. Tratamiento de las películas radiocrómicas</b>     | <b>5</b>  |
| <b>4. Caracterización del irradiador</b>                 | <b>6</b>  |
| 4.1. Protocolo . . . . .                                 | 6         |
| 4.2. Análisis y resultados . . . . .                     | 7         |
| 4.2.1. Curva de dosis en función del tiempo . . . . .    | 7         |
| 4.2.2. Análisis vertical . . . . .                       | 8         |
| 4.2.3. Análisis radial . . . . .                         | 9         |
| 4.2.4. Ecuación de calibración . . . . .                 | 11        |
| <b>5. Factor de atenuación de los tubos</b>              | <b>12</b> |
| 5.1. Protocolo . . . . .                                 | 12        |
| 5.2. Análisis y resultados . . . . .                     | 13        |
| <b>6. Estudio celular</b>                                | <b>14</b> |
| 6.1. Protocolo . . . . .                                 | 14        |
| 6.2. Análisis y resultados . . . . .                     | 15        |
| 6.2.1. Ensayo de supervivencia . . . . .                 | 16        |
| 6.2.2. Cuantificación de la superficie celular . . . . . | 17        |
| <b>7. Conclusiones</b>                                   | <b>18</b> |

# 1. Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud el cáncer es una de las enfermedades más extendidas causando la muerte de decenas de millones de personas por año. Entre las técnicas de tratamiento de esta enfermedad se encuentra la radioterapia (RT), que se fundamenta en la deposición de dosis de radiación en el tumor con el fin de atacar todas las células cancerosas evitando, en la medida de lo posible, la irradiación de los tejidos sanos. Con el fin del avance de este tipo de tratamiento se realizan estudios que han permitido conocer que existen diferencias en la radiosensibilidad, y por tanto en la radiorresistencia, entre distintos tipos de tumores. Adicionalmente, se conoce que existen diferencias de respuesta ante un tratamiento de RT para un mismo tipo de tumor ya que pueden existir variaciones en las propiedades celulares, dando lugar a diferentes subtipos de tumor que pueden ser más o menos resistentes a los tratamientos de radiación. Por ello, es de gran importancia la determinación de la radiosensibilidad celular pues permite caracterizar la efectividad biológica tras la RT para el tipo de tumor o tejido considerado [1].

Una de las definiciones habitualmente utilizadas para caracterizar la muerte celular se basa en establecer que se produce la muerte de una célula cuando esta ha perdido su capacidad de proliferación, eliminando así la posibilidad de formar una colonia. De esta forma, para la determinación de la radiosensibilidad se llevan a cabo ensayos de supervivencia celular que consisten en el estudio de la formación de colonias después de la exposición a la radiación en comparación con las formadas sin exposición [2]. Así, se puede establecer la correlación entre la dosis con las que se irradian las células y la viabilidad de supervivencia (en su defecto muerte) de la línea celular con la que se trate.

Los ensayos de supervivencia se entienden como el estándar de oro para el estudio de células cancerígenas ya que, al contrario de lo que ocurre con células sanas, se caracterizan, entre muchas otras, por la capacidad de proliferación masiva consiguiendo la formación de colonias organizadas a partir de una célula inicial. Para el análisis de la supervivencia se utiliza comúnmente el modelo lineal cuadrático (LQ) que permite determinar la fracción de supervivencia (FS) teniendo en cuenta la dosis de irradiación

$$FS = e^{-\alpha \cdot D - \beta \cdot D^2}, \quad (1)$$

donde  $\alpha$  [ $\text{Gy}^{-1}$ ] mide la radiosensibilidad celular y  $\beta$  [ $\text{Gy}^{-2}$ ] mide la capacidad de reparación de los daños celulares. Por ello, cuanto menor es el cociente de efectividad  $\alpha/\beta$ , mayor es la capacidad de reparación celular. La caracterización de estos parámetros generalmente se consigue a partir de ensayos in vitro que implican conocer con precisión la dosis de irradiación. Puesto que se suelen utilizar irradiadores con fuentes radiactivas como  $^{60}\text{Co}$  o  $^{137}\text{Cs}$  es necesario la caracterización correcta de la dosis proporcionada por este tipo de equipos, no solo por la inhomogeneidad de la dosis sino también porque pueden estar calibrados bajo unas condiciones de medio que no tienen por qué corresponder con las de los ensayos [3].

En particular, el irradiador disponible y utilizado en los ensayos de irradiación llevados a cabo en la Universidad Complutense de Madrid (UCM) corresponde con el que se encuentra en la Instalación Radiactiva Central de la Facultad de Medicina de la UCM, instalación de segunda categoría con fines, principalmente, en investigación. El modelo de irradiador del que se dispone es el Gammacell® 1000 Elite (Gammacell) y se fundamenta principalmente en la utilización de muestras de  $^{137}\text{Cs}$  para irradiar. De esta forma, para determinar con precisión los parámetros radiobiológicos,  $\alpha$  y  $\beta$ , se necesita conocer con precisión tanto la supervivencia celular obtenida como la dosis que reciben las células al ser irradiadas con este equipo.

Concretando más en el Gammacell se debe destacar que el irradiador posee dos fuentes de  $^{137}\text{Cs}$ . Este radionucleido se caracteriza por tener una semivida de  $T_{1/2} = 30,08 \pm 0,09$  años que se desintegra al  $^{137}\text{Ba}$  por vía beta menos ( $\beta^-$ ) el 100 % de las veces. Sin embargo, no siempre se desintegra directamente al estado fundamental del núcleo hijo sino que en la mayoría de las ocasiones acaba en un estado excitado. Un pequeño esquema que resume lo descrito es el siguiente

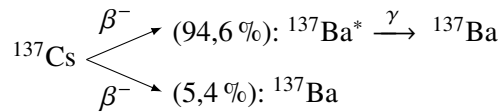
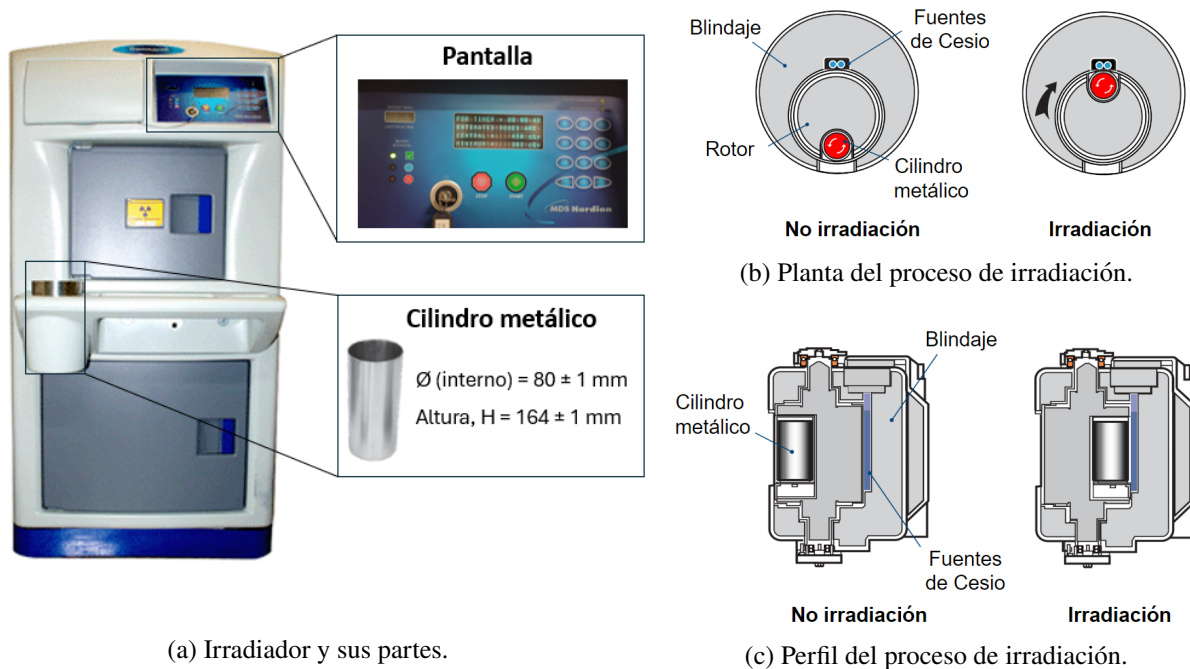


Figura 1: Desintegración del  ${}^{137}\text{Cs}$ .

Como se observa, el 94,6 % de las veces se desintegra a un estado excitado del  ${}^{137}\text{Ba}$  que se desexcita posteriormente ( $T_{1/2} = 2,552 \pm 0,001$  min) emitiendo un fotón de energía bien conocida ( $E_\gamma = 661,7$  keV) [4]. De esta manera, al utilizar el radionucleido para la irradiación de las muestras se puede afirmar que la dosis vendrá dada por la energía por unidad de masa que dejen los fotones al atravesar el material ya que los electrones beta se frenan en el encapsulamiento.



(a) Irradiador y sus partes.

(b) Planta del proceso de irradiación.

(c) Perfil del proceso de irradiación.

Figura 2: Esquema del irradiador y del modo de irradiación. Fuente: [5] con modificaciones propias.

En la Figura (2a) se muestra una imagen del irradiador en la que se tiene ampliada tanto la pantalla como el cilindro metálico donde se introducen las muestras a irradiar. La pantalla permite la monitorización de la irradiación a partir de la asignación del tiempo de exposición ( $t_{exp}$ ) para el que se esté irradiando la muestra o muestras que se introduzcan. También proporciona los valores de dosis central y dosis mínima de irradiación en agua, pues no hay una distribución homogénea de dosis. En la Figura (2b) viene representado un esquema del proceso de irradiación del equipo desde una vista en planta, y la Figura (2c) representa este mismo procedimiento pero con una vista de perfil<sup>1</sup>.

De esta manera se puede simplificar y esquematizar el proceso de irradiación en los siguientes pasos:

1. Tras la colocación de las muestras dentro del cilindro metálico, este se introduce en el propio irradiador. Esencialmente queda posicionado en un rotor con una apertura lo suficientemente grande como para introducirse el bote metálico. Además, el resto de la estructura es opaca a la radiación evitando que al abrir la puerta de apertura exista peligro de irradiación.
2. El cilindro metálico empieza a girar sobre sí mismo.

<sup>1</sup>El esquema del perfil mostrado corresponde con el del equipo Gammacell® 3000 Elan, sin embargo, sirve como representación del proceso que lleva a cabo el irradiador estudiado en el trabajo.

3. El rotor gira sobre su eje produciendo una traslación del bote metálico hasta enfrentarse con las muestras de cesio. Este giro se realiza de forma uniforme tardando 12 segundos desde la carga del cilindro hasta colocarse frente a las fuentes. Durante este proceso, en la fase final del mismo, la apertura del rotor por donde se introdujo el cilindro permite que las muestras queden expuestas a una pequeña fracción de radiación en el intervalo del tiempo que tarda en enfrentarse completamente el bote metálico y las fuentes.
4. Tras el enfrentamiento comienza el periodo de irradiación propiamente dicho y el irradiador empieza a tener en cuenta el tiempo de exposición. Se debe añadir que durante este proceso el bote metálico sigue rotando sobre sí mismo permitiendo homogeneizar la irradiación de todas aquellas partes que se encuentran a la misma distancia radial respecto al centro del cilindro metálico.
5. Una vez pasado el tiempo de exposición las muestras vuelven a la posición inicial junto con el cilindro pudiendo ser recogidas ya irradiadas. Considerar que tras finalizar el tiempo de exposición, tendremos también un tiempo de irradiación extra debido al mismo factor que el del tercer paso.

La consideración conjunta de los dos tiempos en los que las muestras se están irradiando pero el irradiador no los considera como tiempo de exposición se puede caracterizar como tiempo de transición o  $t_0$ . Cabe destacar que las muestras han sido irradiadas de manera inhomogénea ya que al girar el cilindro que las contiene durante la irradiación habrá momentos en los que los extremos estén en la posición más cercana o más lejana de las fuentes mientras que la región central está a una distancia fija del cesio.

Tras el proceso de irradiación, las isodosis del Gammacell, Figura (3), corresponden con tener una distribución de dosis inhomogénea en el interior del cilindro. Los valores de las curva de isodosis mostrados en la imagen pertenecen a una irradiación en la que la región central se irradia con 25 Gy. Se obtiene que en los extremos laterales la dosis ha aumentado mientras que los extremos en altura han adquirido una dosis inferior. Esta representación permite determinar que la irradiación con el Gammacell no viene descrita a partir de un solo valor de dosis sino que es necesario considerar la posición de las muestras dentro del cilindro metálico que se introduce en el propio irradiador. Del mismo modo, destacar que la lectura de dosis en la pantalla del irradiador, Figura (2a), proporcionaría únicamente un valor de dosis central igual a 25 Gy y un valor mínimo de dosis de 24 Gy.

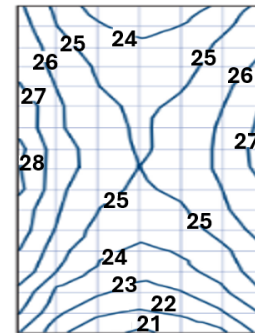


Figura 3: Curvas de isodosis. Fuente: [5] con modificaciones propias.

## 2. Objetivos

El objetivo principal del siguiente trabajo es la calibración de la distribución de dosis que ofrece el irradiador de cesio que se encuentra en la Facultad de Medicina de la UCM, Gammacell® 1000 Elite, de tal forma que se consiga tener una dosimetría precisa sobre las muestras. Como validación a la expresión obtenida se propone la realización de un experimento biológico con una línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-23.

Para cumplir con la motivación propuesta se desarrollan tres experimentos cuyos objetivos individuales son la caracterización del irradiador, la obtención del factor de atenuación de los tubos en los que se irradian células y la validación de la distribución de dosis del irradiador y su influencia en ensayos biológicos. Con el primero de ellos se pretende analizar las tres fuentes de inhomogeneidad del campo:

- Las muestras de la parte más externa del cilindro absorben una dosis de radiación diferente a la absorbida por las muestras situadas en el centro.

- Debido a la física y posición de las fuentes la distribución vertical de dosis no es del todo homogénea.
- Para tiempos de exposición reducidos,  $t_{exp}$  pequeños, puede que el cilindro metálico no complete una vuelta y, por tanto, que la dosis recibida sea diferente incluso para posiciones que se encuentren a una misma distancia respecto al centro del cilindro metálico.

Asimismo, este primer experimento busca obtener la calibración del irradiador en aire puesto que la información proporcionada por el propio equipo viene de una calibración en agua mientras que las muestras se irradian, en su mayoría, en aire y dentro del cilindro metálico. Con los últimos dos experimentos se consigue la validación de la expresión obtenida con el primer análisis y estudiar la implicación biológica de la distribución de dosis.

### 3. Tratamiento de las películas radiocrómicas

Para los estudios desarrollados se hace uso de películas radiocrómicas (RC), por ello, es necesario dedicar un apartado a comprender algunas características de las mismas. Las RC son dosímetros que destacan dentro del campo de la física médica donde el modelo empleado comúnmente en estudios de dosimetría en radioterapia es el *External Beam Therapy* (EBT) que será también el utilizado en los experimentos del presente trabajo. El uso de este modelo es debido principalmente a las propiedades que poseen las RC, pues su respuesta es independiente de la tasa de dosis, tienen una elevada resolución e incluso tienen gran homogeneidad [6, 7].

Para el primer análisis se hace uso de películas EBT4, mientras que en el segundo se utilizan EBT3. Ambos modelos poseen la misma composición, están formados a partir de tres capas superpuestas donde las dos externas corresponden con el recubrimiento de la capa central, el principio activo. Las capas más superficiales componen una base de poliéster transparente con superficie mate de unos  $125 \mu\text{m}$  que encierra el sustrato de principio activo de  $28 \mu\text{m}$  [8, 9]. Esta capa central representa la capa sensible en la que se desencadena un proceso de polimerización parcial cuando incide radiación ionizante produciéndose el oscurecimiento de la película. Están compuestas de hidrógeno con carbono junto a una pequeña proporción de oxígeno, nitrógeno, litio e incluso cloro [10, 11]. A pesar de las similitudes anteriores, la diferencia entre ambos modelos viene dada por el procesado durante la fabricación pues algunas ligeras variaciones han permitido que se mejore la relación señal-ruido, reduciendo las incertidumbres de la dosis leída con las EBT4 frente a las EBT3 [12].

Al irradiar las películas radiocrómicas estas se oscurecen de manera proporcional a la dosis absorbida pudiendo ser escaneadas con el fin de determinar la dosis a partir de dicho oscurecimiento. Además, se debe tener en cuenta la posición de la RC durante su digitalización ya que los polímeros activos de las películas están dispuestos unidireccionalmente, por lo que la dirección de calibración debe ser la misma que para la lectura. Así, en las representaciones posteriores de las RC vendrá una flecha que nos indique la dirección de escaneo.

Tras el escaneo se tienen las imágenes en formato TIFF (*Tagged Image File Format*) configuradas en RGB. De esta forma, la conversión del valor de cada píxel a dosis se realiza teniendo en cuenta la densidad óptica neta,  $netOD$ , que se fundamenta en la caracterización de la variación de la densidad óptica tras haberse irradiado la película radiocrómica. La ecuación para obtener la densidad óptica neta es

$$netOD \pm \Delta netOD = OD_{irrd} - OD_0 \pm \sqrt{\Delta OD_{irrd}^2 + \Delta OD_0^2}, \quad (2)$$

donde  $OD$  representa la densidad óptica y tiene en cuenta el valor máximo que puede tomar un píxel cuando trabaja con 16 bits, 65535, y el propio valor del píxel,  $PV$ , a partir de la expresión  $OD = \log\left(\frac{65535}{PV}\right)$ . El subíndice 0 corresponde con la lectura de una película de control, es decir, que no ha sido irradiada pero que sigue el mismo proceso que las RC que sí son irradiadas. El subíndice  $irrd$  hace referencia a la condición de

irradiación. A partir de esta información, la expresión que permite obtener finalmente la dosis es

$$D = a + b \cdot netOD + c \cdot netOD^n, \quad (3)$$

con incertidumbre

$$\Delta D = \sqrt{(\Delta a)^2 + (netOD \Delta b)^2 + (netOD^n \Delta c)^2 + (n \cdot c \cdot netOD^{n-1} \Delta netOD)^2}. \quad (4)$$

Los parámetros  $a$  [Gy],  $b$  [Gy],  $c$  [Gy] y  $n$  son los coeficientes obtenidos de la calibración para el lote de películas utilizado, donde  $n$  se fija al principio careciendo así de incertidumbre. Para las EBT3 y EBT4 usadas, la calibración fue realizada tras una irradiación previa en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Destacar que esta expresión permite obtener una descripción de dosis para cada píxel de cada uno de los canales. Sin embargo, para realizar un análisis más completo el tratamiento de dosis de cada píxel se hará a partir de un estudio multicanal que se basa en la media ponderada de los canales R, G y B de tal forma que se tiene un valor de dosis junto a su incertidumbre para cada píxel.

## 4. Caracterización del irradiador

### 4.1. Protocolo

Para la caracterización de la distribución de dosis que ofrece el irradiador es necesario tener una buena estadística que permita concluir de manera detallada la curva de dosis correspondiente al Gamma-cell. Por ello, dos películas radiocrómicas EBT4 fueron divididas en seis segmentos cada una de tamaños iguales correspondientes con  $12,7 \text{ cm} \times 6,4 \text{ cm}$  con un error de  $\pm 0,1$  centímetros en cada lado, Figura (4).

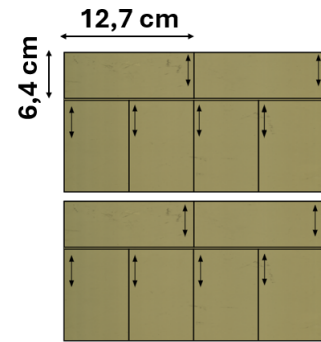


Figura 4: RC del primer experimento.

Con el fin de eliminar cualquier factor que influya en la lectura de la dosis, se utilizan RC vírgenes, es decir, películas que no han sido irradiadas anteriormente. Esto es debido a que, incluso si se conociese de manera rigurosa la dosis que se podría haber dado, esta dosis inicial podría conllevar a un resultado erróneo en la calibración del irradiador.

La irradiación de las películas radiocrómicas se basa en que cuatro de ellas corresponderán con un tiempo de exposición de 12 segundos,  $\{RC_1\}$ . Se irradiaron 4 radiocrómicas bajo las mismas condiciones con el fin de promediar los resultados que ofrecen las 4 películas ya que en las irradiaciones a tan baja dosis las incertidumbres son mayores. Otras siete de las divisiones corresponderían con tiempos múltiplos de esos 12 segundos de tal forma que el subíndice represente el factor de multiplicación,  $\{RC_2, RC_3, RC_4, RC_5, RC_6, RC_7, RC_8\}$ . Además, para tener un control, el último de los fragmentos no se irradió pero llevó el mismo proceso que el resto de las radiocrómicas,  $\{C\}$ . Posteriormente se procede con el escáner de las RC con una lectura que se hizo a tiempo post-irradiación,  $t_{post}$ , de  $28,00 \pm 0,17$  horas evitando eliminar cualquier influencia de la dosis leída con el tiempo post-irradiación. Destacar que una misma radiocrómica es escaneada tres veces con el fin de trabajar con el promedio de los tres escáneres. De esta forma podemos agrupar la información de la siguiente manera

|                | C | RC <sub>1</sub> | RC <sub>2</sub> | RC <sub>3</sub> | RC <sub>4</sub> | RC <sub>5</sub> | RC <sub>6</sub> | RC <sub>7</sub> | RC <sub>8</sub> |
|----------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| $t_{exp}$ [s]  | - | 12              | 24              | 36              | 48              | 60              | 72              | 84              | 96              |
| $t_{post}$ [h] |   |                 |                 |                 | 28,00 ± 0,17    |                 |                 |                 |                 |

Tabla 1: Películas radiocrómicas irradiadas y escaneadas.

## 4.2. Análisis y resultados

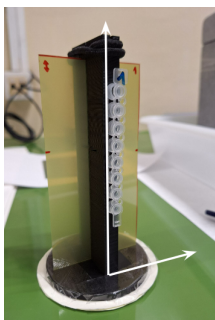


Figura 5: Montaje 1.

La irradiación de las RC se realizó como se presenta en la Figura (5). De esta manera, tenemos un soporte con una región central de plástico que permite la incorporación de viales de *Coumarin* para hacer dosimetría líquida. Estas muestras no serán analizadas en el trabajo ya que se trata de un estudio de otra investigadora. Añadir también que debido a la estructura del soporte la dosis absorbida en la región central de las radiocrómicas se ve apantallada por el plástico.

Así, para el análisis se han establecido unas coordenadas tales que uno de los ejes corresponde con la dirección que marca la altura del irradiador cuyo origen se encuentra en la base del mismo. Por otro lado, el eje radial corresponde con la dirección que representa la distancia radial al centro del cilindro. Las RC fueron situadas en el centro del equipo permitiéndonos establecer un análisis radial para los dos laterales de las películas. De esta forma, una misma radiocrómica nos

establecía información de la región central atenuada y dos estadísticas radiales (una por cada lateral). Del mismo modo, como la base del soporte mide  $5,02 \pm 0,01$  mm la lectura de la dosis en altura para las radiocrómicas corresponderá con medio centímetro por encima de la base del cilindro metálico que contiene las muestras. Debido a esta pequeña diferencia, en los siguientes análisis se especificará si la altura la medimos respecto a la radiocrómica o al origen de irradiación del equipo.

### 4.2.1. Curva de dosis en función del tiempo

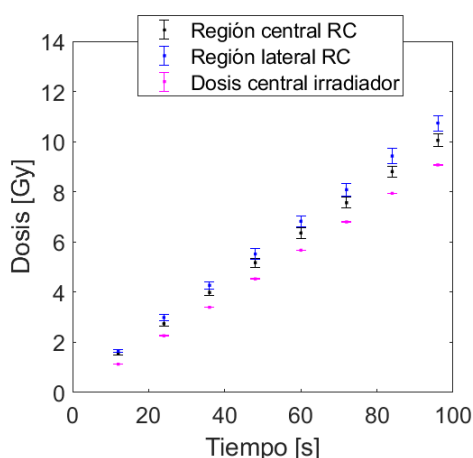


Figura 6: Dosis en función del tiempo.

Comprendiendo la manera de irradiar que tenemos, sección 1, se entiende que existe un tiempo de transición en el que la muestra se está irradiando pero el irradiador no considera dentro del tiempo de exposición determinado, siendo necesario caracterizar dicho valor. Además, la información de dosis que se lee en la pantalla, Figura (2a), corresponde a dosis en agua pero nuestras muestras están en aire. Para mitigar ambos problemas se desarrolla el siguiente análisis.

Tras la irradiación de las RC y su lectura se obtienen las dosis de la región central (atenuada por el plástico del soporte) y las dosis laterales. Si además consideramos la información que nos proporciona el irradiador sobre la dosis central se obtiene la Figura (6). Caracterizando los datos a partir de un ajuste lineal

$$y = m \cdot x + n \quad (5)$$

se determinan los valores que se muestran en la Tabla (2) donde los coeficientes de correlación lineal respectivamente con la información de la tabla son  $R^2 = 0,99994$ ,  $R^2 = 0,99992$ ,  $R^2 = 0,9999991$ , afirmando que el comportamiento seguido por la dosis frente al tiempo es lineal.

|                         | Región central |         | Región lateral |         | Información irradiador |          |
|-------------------------|----------------|---------|----------------|---------|------------------------|----------|
| $m \pm \Delta m$ [Gy/s] | 0,10090        | 0,00032 | 0,11200        | 0,00073 | 0,094560               | 0,000036 |
| $n \pm \Delta n$ [Gy]   | 0,3309         | 0,0019  | 0,3713         | 0,0044  | 0,0052                 | 0,0022   |

Tabla 2: Resultados dosis en función del tiempo.

De esta manera, debido a la presencia de un valor para la ordenada en el origen se establece que existe una dosis extra para las películas radiocrómicas leídas mientras que el propio irradiador no la está considerando,

pues a pesar de que su respectiva ordenada no es compatible con un valor nulo la influencia de esta dosis es mínima y despreciable. Aunque se podría determinar directamente la dosis de transición que reciben las radiocrómicas, es más correcto caracterizar el tiempo de transición,  $t_0$ , ya que la dosis recibida por la muestra, tal y como se demostrará en los estudios posteriores, sigue una distribución radial y corresponde con la misma tasa de irradiación que el de la irradiación propiamente dicha.

Así, la forma correcta de caracterizarlo corresponde con obtener el valor de corte con el eje x de nuestra regresión lineal pues permitirá hallar el valor del tiempo de transición explicado detalladamente en la sección 1. Aunque la obtención de  $t_0$  conlleva obtener un resultado negativo, en la expresión mostrada a continuación se entiende como el valor absoluto pues el signo negativo solo indica que es un tiempo que no se está considerando. De este modo

$$t_0 \pm \Delta t_0 = \frac{n}{m} \left( 1 \pm \sqrt{\left(\frac{\Delta n}{n}\right)^2 + \left(\frac{\Delta m}{m}\right)^2} \right), \quad (6)$$

determinando finalmente, a partir de los valores de la Tabla (2), que

$$t_0 \pm \Delta t_0 = 2,64 \pm 0,40 \text{ s.} \quad (7)$$

La mitad de dicho tiempo se debe al desplazamiento de las muestras, debido al rotor, desde su posicionamiento inicial hasta enfrentarse con las muestras de cesio. La otra mitad se relaciona con la vuelta de la muestra desde su posición de irradiación hasta la posición inicial. Teniendo en cuenta que la mitad del giro se realiza con un movimiento uniforme que dura 12 segundos, explicado en (1), el giro completo correspondería con 24 segundos tal que el 11 % de ese tiempo total se están irradiando las muestras sin encontrarse el cilindro metálico enfrentado a las fuentes.

Además se puede determinar el factor de atenuación debido al plástico central del soporte. Para ello, se hace uso de la expresión siguiente que viene definida como la media ponderada de las razones de las pendientes y ordenadas de los ajustes,

$$F \pm \Delta F = \frac{\frac{M}{\Delta M^2} + \frac{N}{\Delta N^2}}{\frac{1}{\Delta M^2} + \frac{1}{\Delta N^2}} \pm \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{\Delta M^2} + \frac{1}{\Delta N^2}}}, \quad (8)$$

donde  $M = m_{at}/m_{sin at}$  y  $N = n_{at}/n_{sin at}$  y  $\Delta M$  y  $\Delta N$  sus respectivas incertidumbres. Con subíndice *at* hacemos referencia a los parámetros obtenidos a partir de las regiones de las RC cuyas dosis se han visto atenuadas (región central) y el subíndice *sin at* se refiere a las regiones sin atenuar (los laterales). Se concluye así que

$$F \pm \Delta F = 0,8986 \pm 0,0057, \quad (9)$$

permitiendo afirmar que la región central donde tenemos plástico dejan pasar el 90 % de la radiación, o lo que es lo mismo, absorbe un 10 % de la misma. De esta forma, el comportamiento de la región central, Tabla (2), se puede ver corregido por el factor de atenuación debido al plástico estableciendo finalmente que la tasa del irradiador en la región central corresponde con  $Q = 0,11228 \pm 0,00080 \text{ Gy/s}$ .

#### 4.2.2. Análisis vertical

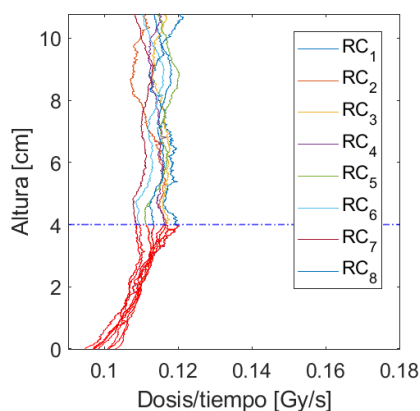
Las alturas expresadas en este apartado se referencian respecto a las radiocrómicas, si queremos determinarlo en función del origen de irradiación debemos considerar los  $5,02 \pm 0,01 \text{ mm}$  de la base del soporte.

Analizando la dosis absorbida por las diferentes radiocrómicas en la dirección vertical lo que se obtiene viene representado en la Figura (7), que no muestra la incertidumbre asociada debido a que se ha buscado tener una mejor visualización de la tendencia obtenida aunque sí se tiene en cuenta en el cálculo. Para la caracterización se ha hecho un estudio de la desviación estándar relativa (RSD) por encima y por debajo de los  $4,00 \pm 0,17 \text{ cm}$  respecto a la base de la radiocrómica. La separación entre estas dos regiones viene

motivada por las curvas de isodosis que definen el modo de irradiación del Gammacell, Figura (3). La ecuación que define la RSD corresponde con

$$RSD [\%] = \left( \frac{\sigma}{\bar{D}} \right) \cdot 100, \quad (10)$$

donde  $\sigma$  es la desviación estándar de los promedios en la dirección vertical y  $\bar{D}$  es el promedio de los valores.



| <b>Inhomogeneidad por encima de los <math>4,00 \pm 0,17</math> cm</b> |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|   | RC <sub>1</sub> | RC <sub>2</sub> | RC <sub>3</sub> | RC <sub>4</sub> | RC <sub>5</sub> | RC <sub>6</sub> | RC <sub>7</sub> | RC <sub>8</sub> |
| <b>RSD [%]</b>  | 1,5             | 1,9             | 1,3             | 1,0             | 1,9             | 1,8             | 1,3             | 1,3             |
| <b>Inhomogeneidad por debajo de los <math>4,00 \pm 0,17</math> cm</b> |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|   | RC <sub>1</sub> | RC <sub>2</sub> | RC <sub>3</sub> | RC <sub>4</sub> | RC <sub>5</sub> | RC <sub>6</sub> | RC <sub>7</sub> | RC <sub>8</sub> |
| <b>RSD [%]</b>  | 7,2             | 6,7             | 5,8             | 7,3             | 5,9             | 7,1             | 6,9             | 7,1             |

Figura 7: Análisis vertical.

Tabla 3: Desviación estándar relativa a diferentes alturas.

A partir de los resultados se concluye que existe una inhomogeneidad vertical inferior al 2 % en la zona superior a los 4 cm y por debajo trabajamos con inhomogeneidades que oscilan entre el 6 % y el 7 %. Esto permite determinar que al variar en altura una muestra, si esta se encuentra en la parte superior, la uniformidad de la tasa de dosis leída podrá variar en un 2 % mientras que en la parte inferior llegaríamos a tener inhomogeneidades de hasta el 7 % si no hemos caracterizado correctamente la altura. Del mismo modo, la variabilidad (diferencia máxima) de la tasa en la parte inferior es de  $2,721 \pm 0,015$  cGy/s, que se corresponde con una diferencia del 22,5 % en la tasa de dosis. Así, la región óptima para colocar las muestras corresponde con ponerlas por encima de los  $4,50 \pm 0,17$  cm respecto a la base del cilindro (origen de irradiación).

#### 4.2.3. Análisis radial

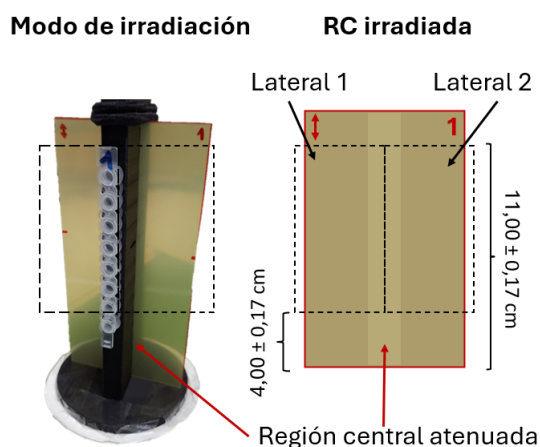


Figura 8: Esquema análisis radial.

Para entender bien este análisis se debe completar lo descrito al inicio de la sección. Puesto que se quiere realizar un análisis radial de la distribución de dosis la lectura de las RC debe hacerse radialmente. De esta forma, puesto que las películas se irradiaron centradas en el cilindro, cada mitad de la misma proporciona, independientemente de la otra, la estadística de un estudio radial. Por tanto, tal y como se observa en la Figura (8), tenemos dos laterales de lectura cuyo origen es la mitad de la RC (región central que está atenuada por el plástico). La dirección radial será positiva hacia la izquierda cuando tratemos con el “Lateral 1” mientras que con el “Lateral 2” la dirección positiva del eje  $r$  es hacia la derecha. Los límites en altura vienen caracterizados por el borde crítico obtenido del análisis vertical y el borde superior de la misma RC.

La caracterización de la distribución de la tasa de dosis en dirección radial para cada una de las películas presenta el comportamiento de la Figura (9) y se basa en la obtención de los promedios en altura de la tasa de una misma radiocrómica en dirección horizontal. Como en estas figuras se presenta  $D/t$  frente a  $r$  el aspecto que se observa corresponde con una región central que se ve atenuada respecto a los extremos.

En el análisis de la sección anterior se ha obtenido el tiempo de transición  $t_0$  que tiene mayor o menor influencia dependiendo de si irradiamos con baja o alta dosis. Al representar la dosis por unidad de tiempo habiendo tenido en cuenta el valor de  $t_0$  los resultados obtenidos permiten una caracterización conjunta de todas las RC pues se adquieren ahora valores compatibles. Esta influencia de  $t_0$  se observa en la Figura (9a) y la Figura (9b) afirmando que si el estudio se realiza sin la consideración del tiempo de transición, la dosis absorbida por las radiocrómicas no se puede generalizar a partir de un comportamiento para todas ellas.

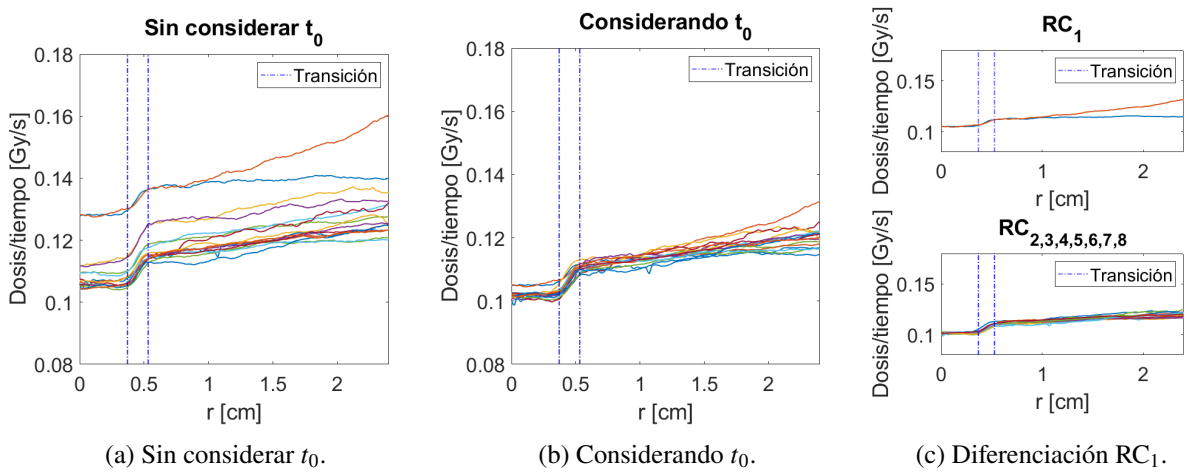


Figura 9: Tasa de dosis en función de la distancia radial. En ninguna de las imágenes anteriores se han representado las incertidumbres (pese a que se utilizan en el cálculo) debido a que se ha buscado tener una mejor visualización de la tendencia comentada.

Si nos centramos en la primera de las radiocrómicas,  $RC_1$ , vemos que ambos lados de la misma han absorbido diferente dosis (incompatibles si se tiene en cuenta la incertidumbre) aún teniendo igual tiempo de exposición. Si realizamos un ajuste lineal, Ecuación (5), cada uno de los laterales proporciona valores de la pendiente diferentes e incompatibles, Tabla (4a). Así se puede establecer que para tiempos de exposición iguales o inferiores a 12 segundos el cilindro metálico no completará una vuelta sobre sí mismo, sección 1, de tal forma que los laterales de las películas no se irradian homogéneamente. Puesto que este comportamiento es inevitable si se quieren dosis bajas de irradiación sabemos que la incertidumbre asociada a la dosis recibida será mayor.

|               | $m \left[ 10^{-3} \frac{\text{Gy}}{\text{cm}\cdot\text{s}} \right]$ | $m \left[ 10^{-3} \frac{\text{Gy}}{\text{cm}\cdot\text{s}} \right]$ | $G \left[ 10^{-3} \frac{\text{Gy}}{\text{cm}\cdot\text{s}} \right]$ |
|---------------|---|---|---|
| <b>Lat. 1</b> | $8,413 \pm 0,092$   | <b>Lat.</b> $5,57 \pm 0,72$   | $t_{exp} < 48s$ $5,6 \pm 2,9$                                       |
| <b>Lat. 2</b> | $3,02 \pm 0,12$   |   | $t_{exp} \geq 48s$ $5,57 \pm 0,72$                                  |
| (a) $RC_1$ .  |   | (b) $RC_{2,3,4,5,6,7,8}$ .  | (c) Aumento radial.   |

Tabla 4: Parámetros de las rectas de ajuste.

Por otro lado, si nos centramos en aquellas que tienen un  $t_{exp} \geq 48$  s, la caracterización lateral de todas ellas tiene un comportamiento repetible que se puede determinar también a partir de un ajuste lineal. Este resultado se muestra en la Tabla (4b). Considerar que los valores de  $R^2$  obtenidos para las regresiones lineales

no toman valores inferiores a 0,948 pudiendo afirmar que la tendencia lineal establecida es correcta para el análisis ya que la “falta” de linealidad (no obtener  $R^2 = 1$ ) se debe principalmente a la limitación en la precisión de la lectura de dosis en las radiocrómicas.

De esta manera, el análisis se concluye diciendo que existe una variación en la dosis leída con respecto a la posición radial que se considere del cilindro metálico. Así, la región central corresponderá con las dosis más bajas aumentando según nos desplazamos en dirección radial hacia los extremos. Para obtener un comportamiento conjunto para cualquier tiempo de exposición se puede establecer diferentes criterios, sin embargo, para el trabajo expuesto se desarrolla el comentado en las siguientes líneas.

En primer lugar, se generaliza un aumento de dosis igual a 5,57 mGy/s cada centímetro que nos desplazamos en dirección radial hacia los extremos concluyendo que la dosis aumentará un 5 % respecto a la central por cada cm que nos desplazemos hacia fuera. Posteriormente, la caracterización de la incertidumbre para tiempos de exposición altos,  $t_{exp} \geq 48$  s, corresponde directamente con lo que se expone en la Tabla (4b) mientras que para tiempos de exposición bajos dicha incertidumbre se obtiene teniendo en cuenta que el resultado final sea compatible con las pendientes (e incertidumbres) obtenidas individualmente para cada lateral determinando finalmente lo presentado en la Tabla (4c).

#### 4.2.4. Ecuación de calibración

Tras todo el estudio anterior se puede concluir una expresión matemática que describe la distribución de dosis que se da en el interior del cilindro metálico que contiene las muestras a irradiar. Esta ecuación es

$$D(t,r,t_{exp}) = \gamma(Q + G \cdot r) \cdot (t_{exp} + t_0), \quad (11)$$

donde  $Q = 0,11228 \pm 0,00080$  Gy/s es la tasa de irradiación en la región central obtenida en el primer análisis, el factor de aumento de la dosis en función de la distancia radial viene dado por  $G = 5,6 \pm 2,9$  mGy/(cm · s) para  $t_{exp} < 48$  s y  $G = 5,57 \pm 0,72$  mGy/(cm · s) para  $t_{exp} \geq 48$  s,  $r$  es la distancia radial en centímetros,  $t_{exp}$  el tiempo de exposición, en segundos, que indicamos al irradiador, y  $t_0 = 2,64 \pm 0,40$  s representa el tiempo de transición. Además, se ha añadido el parámetro  $\gamma = e^{-\ln 2 \frac{t}{T_{1/2}}}$  que tiene en cuenta la caída de la actividad de las fuentes de cesio, donde  $T_{1/2} = 30,08 \pm 0,09$  años y  $t$  corresponde con el tiempo transcurrido desde el momento de la irradiación de las películas radiocrómicas utilizadas para la calibración y el momento en el que se quiere determinar la dosis. La calibración se llevó a cabo el 14 de noviembre de 2023 a las 12:30 p.m. con una incertidumbre temporal de 20 minutos que corresponde con la duración de irradiación de todas las radiocrómicas. Su respectiva incertidumbre viene determinada por

$$\begin{aligned} \Delta D(t,r,t_{exp})^2 = & [\gamma(t_{exp} + t_0)\Delta Q]^2 + [\gamma r(t_{exp} + t_0)\Delta G]^2 + [\gamma(Q + G \cdot r)\Delta t_0]^2 + \\ & + [\gamma G(t_{exp} + t_0)\Delta r]^2 + \left[ D \ln 2 \cdot T_{1/2}^{-1} \Delta t \right]^2 + \left[ D \ln 2 \cdot t \cdot T_{1/2}^{-2} \Delta T_{1/2} \right]^2. \end{aligned} \quad (12)$$

La ecuación anterior no tiene en cuenta la atenuación debido a la región central de nuestro soporte ya que esa característica es debida a nuestra instrumentación y no forma parte de la manera de irradiar del Gammacell.

Una manera que permite visualizar la distribución de dosis que se da dentro del cilindro metálico, el mismo día que se hizo la calibración y por tanto  $\gamma = 1$ , corresponde con lo mostrado en la Figura (10). Esta imagen representa cómo sería la distribución de dosis cuando al irradiador le programamos 48 segundos ofreciéndonos una dosis central de  $4,54 \pm 0,01$  Gy. Como vemos, lo que realmente se irradiaría correspondería con una dosis mínima de  $5,67 \pm 0,29$  Gy en la región central que iría aumentando radialmente hasta una dosis máxima de  $6,80 \pm 0,32$  Gy a los cuatro centímetros del centro. Las regiones representadas en rojo corresponden con una altura inferior a cuatro centímetros y medio que no vienen caracterizadas por la ecuación por lo que no se tiene información precisa de la distribución de dosis en esa región. En la Figura

(10a) se presenta la distribución detallada de la dosis mientras que en la restante, Figura (10b), se representa una visión geométrica de la dosis al mirar y analizar el cilindro metálico.

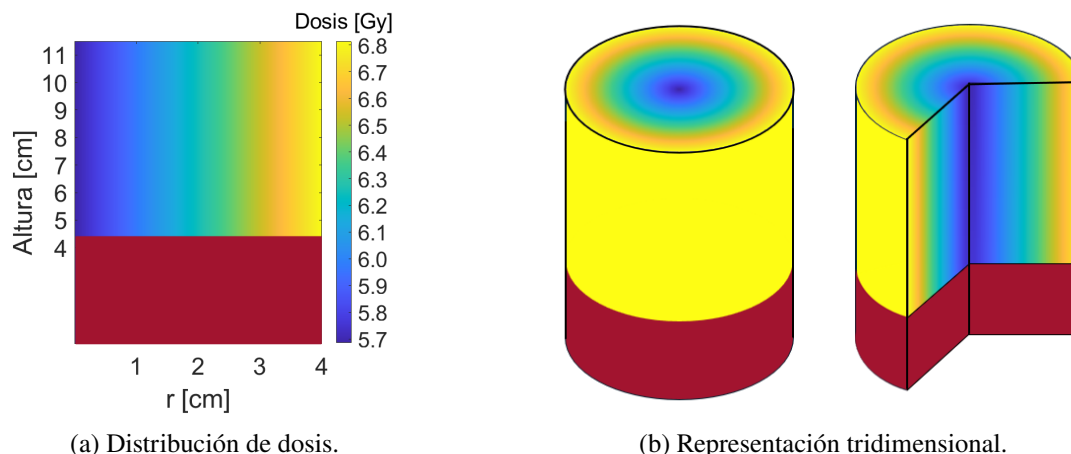


Figura 10: Caracterización del campo de análisis.

## 5. Factor de atenuación de los tubos

Cuando se hace un estudio de irradiación con cultivos celulares, las células deben estar en su medio de cultivo correspondiente. Esto implica que la dosis que van a recibir se verá atenuada debido a la absorción de radiación causada por el soporte en el que se encuentren, en nuestro caso hacemos uso de tubos de la marca Eppendorf. De esta forma, para hacer ensayos biológicos es necesario tener en cuenta el factor de atenuación pues influirá en las conclusiones finales. En este estudio las referencias en alturas vienen expresadas respecto al origen de irradiación, no respecto a la base del soporte.

### 5.1. Protocolo

Para el diseño del soporte que permite analizar la absorción de radiación de los tubos donde se incorporarán las células, se han tenido en cuenta las conclusiones obtenidas en la sección 5. De esta manera se establece que los tubos que contendrán las muestras a irradiar no se encuentren en la región que no tenemos caracterizada. Además, la parte superior del soporte está diseñada de tal forma que permita la colocación de una RC que se use de control en cada irradiación.

Aunque el soporte se utilice posteriormente para la irradiación de células, la caracterización del factor de atenuación debido a los tubos utilizados se lleva a cabo a partir de la lectura de dosis en RC EBT3, asimismo el montaje experimental llevado a cabo corresponde con lo mostrado en la Figura (11). Del mismo modo, si observamos el esquema se determina que las posiciones donde van las pequeñas RC están enumeradas de manera que posibilita una descripción precisa de la altura y posición radial. La posición 2 se ubica en el centro de irradiación pues el soporte tiene el tamaño adecuado para entrar y centrarse en el cilindro metálico,  $\varnothing = 79,60 \pm 0,01$  mm y  $h = 165,58 \pm 0,01$  mm. Adicionalmente, el resto de tubos se encuentran a diferentes posiciones radiales de dos a dos. De igual forma se debe añadir que a pesar de tener caracterizadas dos alturas no deberíamos encontrar diferencias significativas en cuanto a la dosis leída tal y como habíamos concluido a partir de las homogeneidades del estudio 4.2.2. La información de la altura, distancia radial y enumeración en el soporte queda resumida en la Tabla (5).

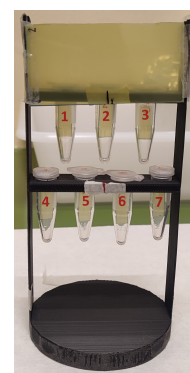


Figura 11: Montaje 2.

|             |               | Posición radial [cm] |               |               |               |
|-------------|---------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|
|             |               | 0,001 ± 0,001        | 0,995 ± 0,001 | 1,991 ± 0,001 | 2,981 ± 0,001 |
| Altura [cm] | 8,785 ± 0,001 | 2                    | -             | 1 y 3         | -             |
|             | 5,482 ± 0,001 | -                    | 5 y 6         | -             | 4 y 7         |

Tabla 5: Altura, distancia radial y enumeración de las posiciones de soporte.

Una vez impreso el soporte, el protocolo establecido consistió en la división de 14 fragmentos de radiocrómicas con dimensiones de 0,7 cm × 1,7 cm con un error de ± 0,1 centímetros en cada lado consiguiendo así la incorporación de estos segmentos en los tubos. De igual forma, se utilizaron dos RC de tamaño (7,7 × 3,4) ± 0,1 cm, que serán las que se posicionen en la parte superior tal que permitan caracterizar correctamente la dosis dada en las dos irradiaciones. Al igual que en el caso anterior las radiocrómicas eran vírgenes logrando que no influyese su uso anterior. Posteriormente se llevaron a cabo dos irradiaciones, la primera con un tiempo de exposición de 48 s y la segunda de 96 s, donde, para cada irradiación, se utilizaban siete radiocrómicas pequeñas introducidas en los tubos y una película ubicada en la superficie superior que sirve de control de la dosis absorbida sin atenuación. También se tenía una RC pequeña y otra RC grande que no se irradiaron y que sirven de control. Destacar que una misma radiocrómica es escaneada tres veces utilizando el promedio de todas ellas y que la lectura se hizo tras haber pasado 3 días desde la irradiación.

## 5.2. Análisis y resultados

Una vez escaneadas las películas, se tiene información de la dosis de las 14 radiocrómicas que se encontraban dentro de un tubo durante la irradiación y de las dos que no se veían atenuadas. La mitad de las RC se irradiaron con un tiempo de exposición y la otra mitad con otro, tal y como se desarrolló en el protocolo. De esta forma, caracterizando la dosis y dosis/tiempo leída en función de la posición de aquellas RC más pequeñas se consiguen las representaciones de la Figura (12).

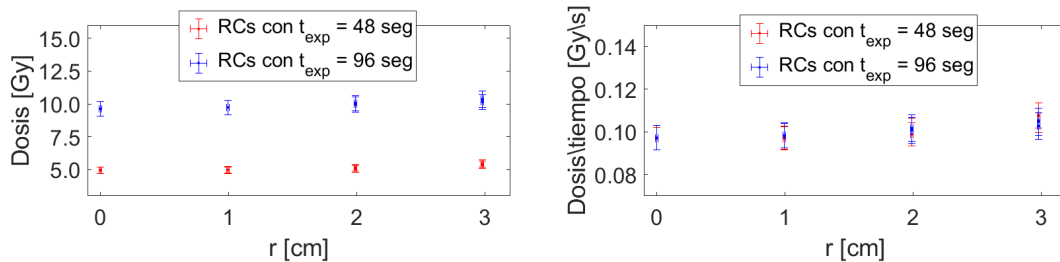


Figura 12: Dosis y dosis/tiempo de las películas radiocrómicas introducidas en los tubos.

Analizando la figura que encontramos a la izquierda, se puede determinar que la dosis leída en función de la distancia radial aumenta tal y como esperábamos. Además, a pesar de que en la pantalla del irradiador la dosis central que nos ofrecía correspondía con  $4,53 \pm 0,01$  Gy para las representadas en rojo y  $9,04 \pm 0,01$  Gy para las azules, la dosis realmente leída es superior debido a los efectos ya estudiados.

Puesto que se busca caracterizar la atenuación debido al uso de los tubos en nuestras muestras, debemos generalizar el estudio a partir de la lectura de dosis/tiempo. Así, obtenemos la representación de la derecha de la Figura (12), donde todas las medidas de dosis/tiempo para una misma posición radial son compatibles. De este modo, se puede promediar la dosis/tiempo que define cada posición radial obteniéndose que el comportamiento descrito tiene una tendencia lineal. Adicionalmente, tras la lectura de las dos RC situadas en la parte superior del soporte, las que no se veían atenuadas, se puede realizar un estudio de las mismas basado en la caracterización de la dosis/tiempo y en la obtención del promedio en altura en dirección horizontal. El comportamiento que sigue también se define con una progresión lineal. Todos los resultados son los que se observan en la Figura (13) y a partir de un ajuste lineal se consiguen obtener los valores de la Tabla (6) y

Tala (7). Los coeficientes de correlación lineal son  $R^2 = 0,922$  y  $R^2 = 0,958$  respectivamente confirmando la bondad de ambos ajustes.

|                              | Sin atenuación |         |
|------------------------------|----------------|---------|
| $m \pm \Delta m$ [Gy/(s·cm)] | 0,00299        | 0,00051 |
| $n \pm \Delta n$ [Gy/s]      | 0,1068         | 0,0022  |

Tabla 6: RC sin atenuación.

|                              | Con atenuación |         |
|------------------------------|----------------|---------|
| $m \pm \Delta m$ [Gy/(s·cm)] | 0,00277        | 0,00145 |
| $n \pm \Delta n$ [Gy/s]      | 0,0964         | 0,0026  |

Tabla 7: RC con atenuación.

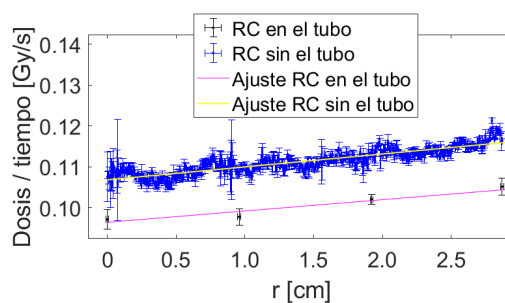


Figura 13: Dosis/tiempo y ajustes lineales.

A partir de los resultados la caracterización de la atenuación de los tubos viene definida por la Ecuación (8). En este caso, el subíndice *at* hace referencia a los las RC que se ubicaban dentro del tubo (la dosis se ve atenuada) y el subíndice *sin at* se refiere a las películas que se irradiaron fuera del tubo. Así, se consigue

$$F \pm \Delta F = 0,903 \pm 0,031 \quad (13)$$

afirmando que los tubos dejan pasar el 90 % de la radiación, es decir, absorben un 10 % de la misma.

## 6. Estudio celular

Para poder corroborar que la calibración obtenida del irradiador tiene un efecto biológico, dicha inhomogeneidad en la distribución de dosis tiene que verse reflejada en estudios que conlleven la irradiación de muestras biológicas en distintas posiciones del cilindro metálico. De esta manera, se ha llevado a cabo un ensayo biológico con una línea celular de cáncer de mama humano, MDA-MB-231 (ATCC:CRM-HTB-26), utilizada de manera recurrente en este tipo de estudios debido a su resistencia a la radiación.

### 6.1. Protocolo

La línea celular empleada, MDA-MB-231, creció en medio mitad DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) (4,5 g/L) y mitad F12 en relación 1:1 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, HEPES 20mM a pH 7,4 y antibióticos (penicilina, 12  $\mu$ g/l; estreptomina, 10  $\mu$ g/ml) a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> y atmósfera humificada. Una vez se alcanzó una confluencia celular entre el 80 %-90 % las células se subcultivaron mediante tratamiento con tripsina parando la acción de la tripsina con medio DMEM:F12 suplementados con FBS al 10 %. El día de la irradiación corresponde con el día que se tripsinizaron las células y, además, se contó el número de las mismas usando una cámara de Neubauer determinando el número de células totales en el medio que contiene las células en suspensión.

Para saber cuantas células formarán parte del estudio se debe considerar que se llevan a cabo tres condiciones de irradiación,  $t_{exp} = 0$  s (control),  $t_{exp} = 48$  s y  $t_{exp} = 96$  s, para el cual las células a irradiarse deberán colocarse en 7 tubos diferentes tal y como se expresa en la Tabla (5) observándose en la Figura (14). La RC presente permite hacer un control de la dosis irradiada. Así se puede corroborar si el comportamiento obtenido es coherente con la distribución de dosis caracterizada del irradiador, Ecuación (11). Además, cabe destacar que se siembran densidades celulares crecientes según aumenta el tiempo de exposición (y por tanto la dosis) fundamentado en que si se irradia con dosis mayores la supervivencia esperada es menor que con dosis bajas.

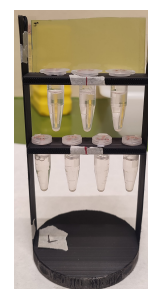
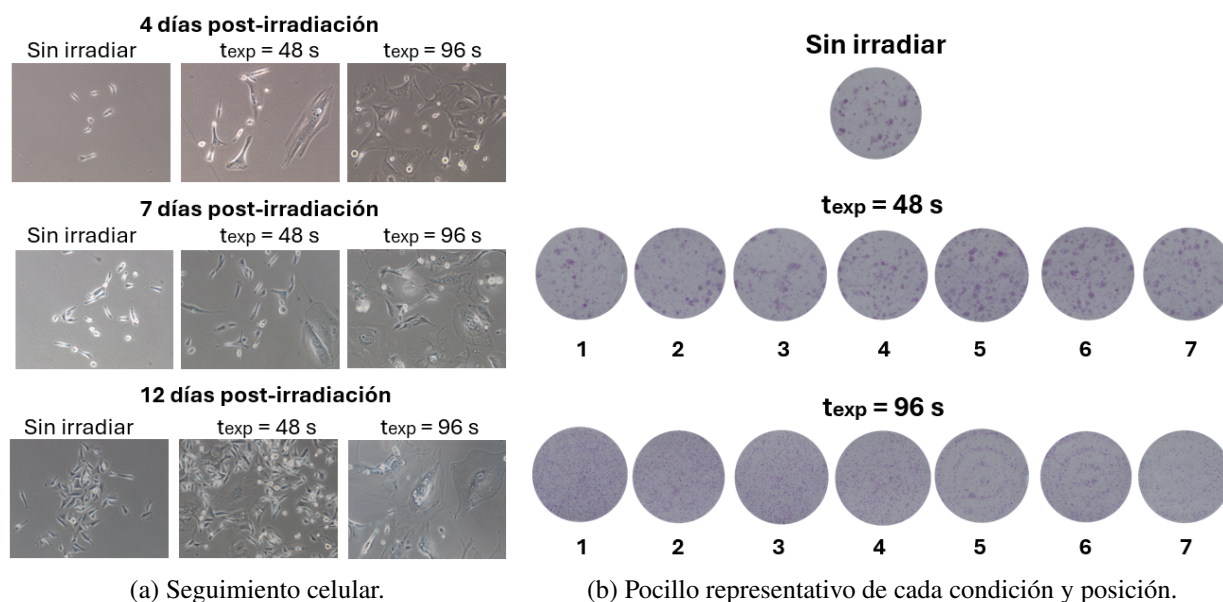


Figura 14: Montaje 3.

Seguidamente se consiguió la distribución de las células, junto a su correspondiente medio, en 15 tubos diferentes (1 de control, 7 para  $t_{exp} = 48$  s y 7 para  $t_{exp} = 96$  s), con 1ml cada uno de ellos de tal modo que se llevaron a cabo las irradiaciones con el Gammacell de la Facultad de Medicina de la UCM. Posteriormente, las células irradiadas (de un mismo tubo) se suspendieron en 6ml que fueron homogéneamente distribuidos en 3 pocillos diferentes de una misma *Multiwell* P6. Así se tiene una estadística por triplicado para cada uno de los 15 tubos. En el paso de los tubo a los pocillos se debe cambiar el medio de cultivo eliminando así la contribución de residuo tóxico que pueda quedar tras haber estado expuesto a la radiación ionizante quedando finalmente 2 ml de crecimiento, DMEM:F12, en cada uno de los pocillos.



(a) Seguimiento celular.

(b) Pocillo representativo de cada condición y posición.

Figura 15: Resultados celulares.

A partir de este momento se realizó un seguimiento de las células a lo largo de los 15 días posteriores que correspondía con ir observando en el microscopio el desarrollo y crecimiento de las colonias. Durante el transcurso de la supervisión se pudieron ver diferencias y cambios significativos entre los pocillos con células irradiadas y las que no y diferencias entre las condiciones de diferente irradiación, Figura (15a). En el Anexo I se muestran todas las imágenes adquiridas a lo largo del seguimiento. Se debe destacar que durante este seguimiento se fue sustituyendo el medio a los pocillos cada tres días de tal forma que las células se encontrasen en las condiciones óptimas de nutrición y pudieran seguir dividiéndose.

Finalmente se fijaron químicamente todas las células con el objetivo de mantener la estructura que tienen en estado vivo y así realizar el análisis estadístico de las colonias formadas. Para la fijación se procedió retirando el medio, lavando los pocillos dos veces con un tampón fosfato salino (PBS) y posteriormente se añadió la solución fijadora que contiene 0,2 % etanol y 0,5 % Cristal violeta. Tras esperar 20 minutos se lava con agua cada pocillo con el fin de tener las *Multiwells* en las condiciones óptimas para llevar a cabo el conteo de las colonias. Para cada condición considerada, uno de los tres pocillos de cada posición corresponde con lo que se observa en la Figura (15b). En el Anexo II se encuentran las imágenes de todos los pocillos.

## 6.2. Análisis y resultados

Teniendo en cuenta lo observado en el seguimiento celular, Figura (15a), y los resultados obtenidos tras la fijación de las células, Figura (15b), es posible contar el número de colonias formadas para la irradiación de 48 segundos. Sin embargo, para la irradiación de 96 segundos las imágenes observadas en el microscopio, Figura (15a), permiten determinar que tras la irradiación con ese tiempo de exposición las células entran en

estado de senescencia y no forman colonias. Las células senescentes son células que han perdido su capacidad proliferativa, [13], y corresponde con un tipo de respuesta de las células tumorales ante la radiación, [14], interpretándose así como células muertas tal y como se comentó en la introducción del trabajo. Por ello se realiza un análisis separado para cada condición; supervivencia y senescencia mediante superficie celular.

### 6.2.1. Ensayo de supervivencia

Para realizar el estudio de supervivencia propiamente dicho y analizar si las diferencias de dosis debido a su posición se ven reflejadas en el ensayo con las células de la línea MDA-MB-231, se contaron las colonias formadas tras la irradiación de cada tubo y posterior siembra en los tres pocillos. Al dividirse la misma muestra (un tubo) en tres pocillos permite tener un estudio por triplicado que puede entenderse como una réplica técnica de tal forma que se tiene una estadística mayor para realizar el análisis. Se debe considerar también que al tener dos tubos Eppendorfs para una misma distancia radial (excepto para la posición central) se tiene una mayor estadística para un mismo valor de  $r$ . Así, se contaron tanto los tres pocillos del control como los tres pocillos de las siete posiciones diferentes para  $t_{exp} = 48$  s. De esta forma, se puede completar la Tabla (8) donde vienen expuestos los valores de supervivencia de cada posición normalizado respecto al control, la dosis para cada distancia radial partiendo de la ecuación del irradiador obtenida en este trabajo, Ecuación (11), y considerando la atenuación de la dosis debida a los tubos, resultado (13).

|           |                   |                   |                   |                   |
|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| $r$ [cm]  | $0,001 \pm 0,001$ | $0,995 \pm 0,001$ | $1,991 \pm 0,001$ | $2,981 \pm 0,001$ |
| D [Gy]    | $5,06 \pm 0,26$   | $5,31 \pm 0,26$   | $5,56 \pm 0,27$   | $5,81 \pm 0,28$   |
| FS medida | $0,856 \pm 0,098$ | $0,823 \pm 0,081$ | $0,76 \pm 0,11$   | $0,724 \pm 0,058$ |

Tabla 8: Dosis y supervivencia normalizada para las cuatro posiciones radiales estudiadas.

Analizando directamente los resultados de la Tabla (8) se puede establecer que las inhomogeneidades en la distribución de dosis proporcionada por el irradiador se ven reflejadas directamente en la supervivencia celular. Teniendo en cuenta las posiciones de nuestro soporte, la variación máxima de dosis que encontramos es del 15% y corresponde con una variación de la supervivencia medida del 15%. De igual forma, si analizamos la región central ( $0,001 \pm 0,001$  cm) respecto a la siguiente más próxima ( $0,995 \pm 0,001$  cm), se tiene una diferencia de  $0,9940 \pm 0,0014$  cm que se ve reflejado en una variación de dosis del 5% y desviación de la supervivencia del 3,9%. De esta manera se puede afirmar que existe una influencia directa entre la posición en la que se colocan las muestras y la respuesta biológica a la dosis recibida.

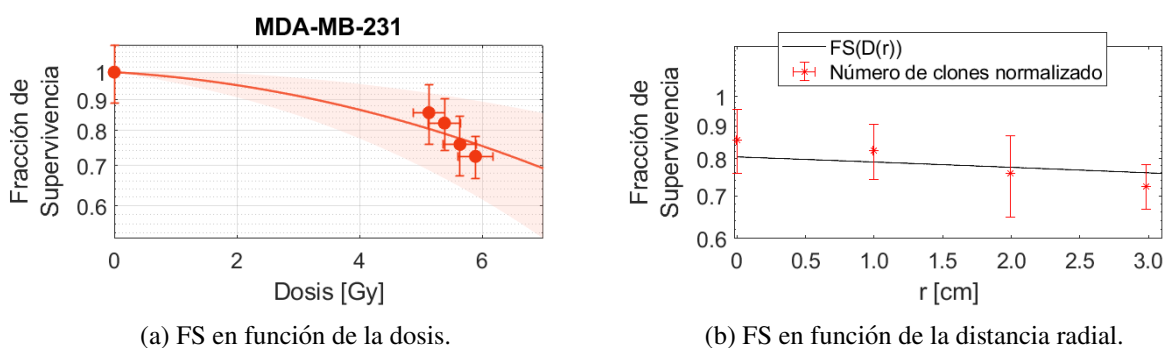


Figura 16: Supervivencia frente a la dosis y la posición radial.

A partir de los resultados se pueden hacer diferentes estudios. En primer lugar, en la Figura (16a) se representa la fracción de supervivencia en función de la dosis recibida pudiendo establecer una gráfica que describa los resultados correspondientes al modelo LQ, Ecuación (1). Para la obtención de esta representación se parte del parámetro  $\beta$  característico del modelo tomado de la referencia [1], y a partir de un proceso de

*bootstrapping* se obtienen los valores experimentales de este trabajo tanto de  $\alpha = 0,034 \pm 0,032$  1/Gy como  $\beta = 0,0055 \pm 0,0037$  1/Gy<sup>2</sup>. Se puede comentar de estos valores que, a parte de la baja precisión de los mismos, el parámetro  $\alpha$  no es compatible con el de referencia aunque mientras que  $\beta$  sí que lo es. Esto se debe principalmente a que el método llevado a cabo consiste en un ajuste muy degenerado y al tener los puntos representativos muy próximos entre sí en dosis, el ajuste no es preciso y por tanto la incertidumbre de los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  es elevada.

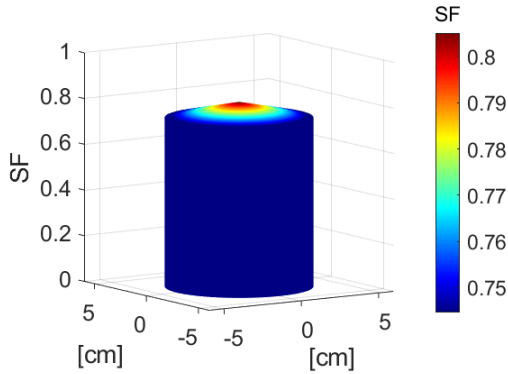


Figura 17: Fracción de Supervivencia 3D.

Adicionalmente, a partir de los resultados expuestos en la Tabla (8), teniendo en cuenta los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  obtenidos y considerando la Ecuación (1) se establece la Figura (16b) con la que se consiguen las mismas conclusiones que las comentadas. Esto es, la diferente localización de la muestras dentro del cilindro metálico influye directamente en la fracción de supervivencia de las células que es debido, a su vez, a la diferencia de dosis. La representación tridimensional de la curva de supervivencia dentro del cilindro metálico en el que se introducen las células se puede visualizar en Figura (17) permitiendo entender mejor la FS obtenida dependiendo de la posición en la que se encuentre la muestra que se irradia.

### 6.2.2. Cuantificación de la superficie celular

Para el caso de irradiación con  $t_{exp} = 96$  s no se ha llevado a cabo el estudio caracterizado por el conteo de clones celulares pues no se consigue diferenciar en los pocillos correspondientes, Figura (16a), las células senescentes de las posibles colonias. Así, se puede establecer que para la línea celular tratada esta elevada exposición conlleva a inhibir la capacidad proliferativa ya sea por la muerte directa o por la evolución de la célula a un estado de senescencia [13].

Con todo ello, se ha desarrollado un estudio basado en la cuantificación de la superficie ocupada por las células (que en principio se consideran senescentes) dentro de cada pocillo. Esta decisión se fundamenta en entender que cuando la dosis de irradiación no es letal pero sí lo suficientemente alta como para producir un daño masivo, la célula entra en estado de senescencia [14]. Así, los tubos que reciben dosis mayores resultan en un mayor número de muertes celulares de manera directa. Esto hace que al cambiar el medio desde la irradiación a la incorporación de las células a los pocillos, no sean capaces las células de fijarse ni desarrollarse como célula viva ni senescente. Por el contrario, en los tubos con menor dosis habrá menos daño letal, y por tanto habrá más células que sean capaces de fijarse pero que se desarrollarán como células senescentes debido la elevada dosis recibida.

Cuantificando la superficie ocupada por las células senescentes de los pocillos, regiones violetas de la Figura (15b), para cada una de las posiciones se tienen los resultados mostrados en la Tabla (9).

| r [cm]   | 0,001 ± 0,001 | 0,995 ± 0,001 |             | 1,991 ± 0,001 |             | 2,981 ± 0,001 |             |
|----------|---------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| Posición | 2             | 5             | 6           | 1             | 3           | 4             | 7           |
| S [%]    | 3,45 ± 0,50   | 2,92 ± 0,47   | 2,85 ± 0,74 | 3,67 ± 0,98   | 2,75 ± 0,31 | 2,34 ± 0,63   | 1,60 ± 0,24 |

Tabla 9: Superficie celular para cada posición.

Tras lo obtenido se comprueba que la posición 1, correspondiente con la tercera distancia radial, muestra un resultado elevado respecto al seguido por el resto de posiciones ya que representa la mayor superficie ocupada. Aún así se trata de un resultado compatible con la otra medida para la misma ubicación radial,

posición 3. De igual forma, a partir de los resultados de la Tabla (9) se estable la Figura (18) donde no se muestran los resultados de manera individual sino la media ponderada para cada posición radial.

Como no existe una relación directa entre la dosis y el número de células que evolucionan a un estado de senescencia, establecer una ecuación que relacione la superficie celular ocupada por las células senescentes con respecto a la posición radial o dosis no es totalmente correcto. Sin embargo, estudiando los resultados ponderados para cada posición radial, Figura (18), existe una tendencia fundamentada en la disminución de la superficie. Así, se puede establecer que se obtiene una menor área ocupada por las células senescentes según se toman posiciones radiales mayores y por tanto dosis de irradiación superiores.

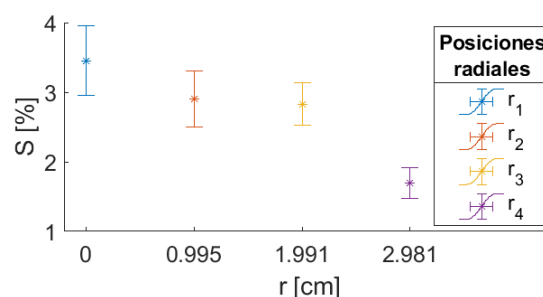


Figura 18: Superficie celular.

Este resultado es coherente con la suposición inicial ya que a distancias radiales mayores, la dosis de irradiación es superior resultando en una mayor proporción de daño letal. Esto conlleva a una menor cantidad de células que pueden evolucionar a un estado de senescencia pues no son capaces de fijarse tras el cambio de medio después de la irradiación.

## 7. Conclusiones

Una vez explicados los tres experimentos llevados a cabo y analizado los resultados adquiridos, es necesario hacer una recapitulación de las conclusiones obtenidas. Asimismo, se puede realizar un análisis crítico que establezca las limitaciones que se han tenido proponiendo mejoras para la continuación del trabajo.

Tras la explicación inicial del Gammacell<sup>®</sup> 1000 Elite se consigue determinar la existencia de inhomogeneidades en la distribución de la dosis dentro del cilindro metálico en el que se irradian las muestras. Esta falta de uniformidad se debe a que el centro del cilindro metálico está más lejos de las fuentes que los extremos. También, el posicionamiento de las fuentes proporciona una distribución desigual de la dosis en dirección vertical, y para tiempos de exposición reducidos el propio cilindro no completa una vuelta sobre su eje proporcionando dosis diferentes aún para distancias radiales iguales. Además, la dosis proporcionada por el irradiador parte de una calibración en agua y la mayoría de muestras se irradian en aire. Añadir también que existe un tiempo de irradiación debido al movimiento de traslación del propio cilindro desde la posición de carga hasta el enfrentamiento del mismo con las fuentes (y durante el regreso). De esta forma, a partir del análisis de la *Caracterización del irradiador* (sección 4), se ha obtenido una ecuación que describe la distribución de dosis dentro del cilindro en el que se posicionan las muestras que van a ser irradiadas.

En un primer lugar, con el estudio *Análisis vertical* de la sección 4.2.2 se establece que por debajo de los  $4,50 \pm 0,17$  cm respecto a la base del cilindro existe una inhomogeneidad de la tasa de dosis que alcanza el 7% y que corresponde con una diferencia máxima de la tasa de  $2,721 \pm 0,015$  cGy/s o lo que es lo mismo, la diferencia de tasa de dosis entre la base y esa altura crítica es del 22,5%. Sin embargo, por encima de esta altura la homogeneidad es superior al 98% estableciendo que la región a caracterizar por la ecuación considere la parte superior a los  $4,50 \pm 0,17$  cm.

La determinación de la expresión empieza por considerar el factor  $\gamma = e^{-\ln 2 \frac{t}{T_{1/2}}}$  que describe la caída de la actividad de las fuentes desde el día de la caracterización, 14/11/2023 a las 12:30 p.m., hasta el día en el que se desea determinar la dosis. El resto de parámetros se han obtenido a partir de diferentes análisis desarrollados, sección 4, que se divide en varios subapartados. Así, la expresión final corresponde con

$$D(t,r,t_{exp}) = \gamma(Q + G \cdot r) \cdot (t_{exp} + t_0)$$

### Parámetros

$$\gamma = e^{-\ln 2 \frac{t}{T_{1/2}}}$$

$$Q = 0,11228 \pm 0,00080 \text{ Gy/s}$$

$$G = \begin{cases} 5,6 \pm 2,9 \frac{\text{mGy}}{\text{cm}\cdot\text{s}} & \text{para } t_{exp} < 48 \text{ s} \\ 5,57 \pm 0,72 \frac{\text{mGy}}{\text{cm}\cdot\text{s}} & \text{para } t_{exp} \geq 48 \text{ s} \end{cases}$$

$$t_0 = 2,64 \pm 0,40 \text{ s}$$

Con el análisis *Curva de dosis en función del tiempo* se consigue la caracterización de la tasa del irradiador en la región central  $Q$ , con un error relativo del 1 %. También se obtiene el tiempo de transición  $t_0$  estableciendo que durante el 11 % del tiempo de giro del rotor se produce irradiación de las muestras sin que el propio cilindro esté enfrentado con las fuentes. Más allá del objetivo principal, se hace un análisis de la influencia del soporte utilizado estableciendo que el mismo atenúa un 10 % la radiación que llega a las muestras en la región central.

La expresión también viene descrita por el parámetro  $G$ , obtenido en la sección 4.2.3, y representa el gradiente de dosis en dirección radial. Para tiempos de exposición reducidos la rotación del propio cilindro sobre su eje puede no completar una vuelta resultando en una inhomogeneidad añadida. De esta forma, se ha caracterizado un valor de  $G$  para aquellas irradiaciones con tiempo de exposición lo suficientemente elevado como para que se realice al menos una vuelta completa ( $t \geq 48$  s) y otro valor para cuando no se da esta condición ( $t < 48$  s). Así, se determina que, en aspectos generales, se tiene una variación de la dosis del 5 % por cada centímetro que nos desplazamos en dirección radial, siendo mayor la dosis en los extremos respecto al centro. Adicionalmente es necesario destacar que  $t$  representa el tiempo desde la caracterización de la ecuación hasta la utilización de la misma,  $r$  es la distancia radial (respecto al centro del cilindro) que se considera y  $t_{exp}$  corresponde con el tiempo de exposición que se introduce en la pantalla del irradiador.

De acorde a este primer experimento, se debe tener en cuenta que la ecuación obtenida describe una región limitada entre una altura de  $4,50 \pm 0,17$  cm y  $11,00 \pm 0,17$  cm. La región superior a los once centímetros no se tiene caracterizada debido al tamaño de las radiocrómicas utilizadas. Sin embargo, es de esperar que hasta los  $14,5 \pm 0,1$  cm la ecuación siga proporcionando una buena descripción de la dosis mientras que para alturas superiores no sea una buena representación de la misma debido a lo observado en las curvas de isodosis de la Figura (3). Así, este proyecto podría ampliarse realizándose un estudio detallado de la parte inferior y superior del cilindro permitiendo la caracterización total de la distribución de dosis.

En la sección 5 se expone el segundo de los proyectos, *Factor de atenuación de los tubos*. Este desarrollo sirve de nexo entre el primer y tercer experimento ya que permite obtener que los tubos utilizados en la irradiación celular absorben un 10 % de la radiación. Esto se debe a que el factor que dejan pasar de la misma es  $F = 0,903 \pm 0,031$ . De esta manera se tiene caracterizada la influencia de los tubos en la radiación y se puede cuantificar la dosis que absorben de manera efectiva las células del estudio celular realizado.

El último de los experimentos se explica en la sección 6, *Estudio celular*. Permite, a partir de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (ATCC:CRM-HTB-26), la validación de la ecuación de la distribución de dosis en el interior del cilindro metálico. Con el *Ensayo de supervivencia*, sección 6.2.1, se obtiene que la dependencia de la dosis con la posición radial influye directamente en la supervivencia celular. Así, a partir de un único tiempo de exposición,  $t = 48$  s, se consiguen los parámetros  $\alpha = 0,034 \pm 0,032$  1/Gy y  $\beta = 0,0055 \pm 0,0037$  1/Gy<sup>2</sup>, este último compatible con los resultados de la bibliografía, [1]. Esto permite afirmar que la ecuación obtenida representa la situación de irradiación dentro del cilindro y permite la determinación de los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  característicos del modelo. Para la mejora de este proyecto se podría

considerar, al menos, otro tiempo de exposición. De esta forma se tendría una mayor estadística de la supervivencia y por tanto, el desarrollo para la obtención de  $\alpha$  y  $\beta$  no sería tan degenerado pudiendo obtener resultados compatibles con los de la bibliografía en ambos casos.

Con el último estudio desarrollado en la sección 6.2.2, *Cuantificación de la superficie celular*, se concluye, a partir de un tiempo de exposición  $t_{exp}$ , que la diferencia de dosis dentro del cilindro influye directamente en el daño celular causado. Por ello, en las regiones centrales donde la dosis es más baja, el daño causado es menor permitiendo que las células evolucionen a un estado de senescencia. Por el contrario, en las regiones más externas la dosis es mayor de tal forma que se produce mayor daño letal evitando que las células sean capaces de fijarse tras el cambio de medio después de la irradiación y que se desarrollen como células senescentes. Como futuro estudio se podría plantear un análisis al microscopio más detallado de lo que representa una célula senescente o un clon dentro de los pocillos, pudiendo establecer una relación entre la dosis (que depende de la posición) y la muerte directa, o incluso con la pérdida de la capacidad proliferativa.

Con todo lo expuesto se puede concluir que la distribución de dosis del Gammacell<sup>®</sup> 1000 Elite puede ser descrita por la ecuación analítica obtenida consiguiendo mejorar la precisión en el conocimiento de la dosis.

## Bibliografía

- [1] G. Savoca et al., *Local disease-free survival rate (lsr) application to personalize radiation therapy treatments in breast cancer models*, *Journal of personalized medicine* **10** (2020), no. 4 177.
- [2] A. Munshi y other, *Clonogenic cell survival assay*, *Chemosensitivity: Volume 1 In Vitro Assays* (2005).
- [3] J. Kamen et al., *Successful migration from radioactive irradiators to x-ray irradiators in one of the largest medical centers in the us*, *Health Physics* **117** (2019), no. 5 558–570.
- [4] NNDC, *National nuclear data center*, <https://www.nndc.bnl.gov/nudat3/> (NuDat 3.0).
- [5] B. Theratronics, *Gammacell 1000 Elite/3000 Elan, Superior Performance and Unparalleled Dose Uniformity* (2021).
- [6] C. Ruiz-Morales et al., *Optimizing the recalibration process in radiochromic film dosimetry*, *Physics in Medicine & Biology* **65** (2020), no. 1 015016.
- [7] J. A. Vera Sánchez et al., *Estudio del ruido y análisis de incertidumbre en dosimetría con película radiocrómica*, *Tesis Doctoral* (2018).
- [8] A. I. Inc, *Gafchromic<sup>TM</sup> dosimetry media, type EBT3*, [http://www.gafchromic.com/documents/EBT3\\_Specifications.pdf](http://www.gafchromic.com/documents/EBT3_Specifications.pdf) (2022).
- [9] A. I. Inc, *Gafchromic<sup>TM</sup> dosimetry media, type EBT4*, [https://www.ashland.com/file\\_source/Ashland/Documents/Gafchromic%20EBT4%20brochure.pdf](https://www.ashland.com/file_source/Ashland/Documents/Gafchromic%20EBT4%20brochure.pdf) (2022).
- [10] D. Sanchez-Parcerisa et al., *Radiochromic film dosimetry for protons up to 10 mev with ebt2, ebt3 and unlamined ebt3 films*, *Physics in Medicine & Biology* **66** (2021), no. 11 115006.
- [11] R. Arráns et al., *Dosimetría con películas radiocrómicas*, *Rev Fis Med* **10** (2009), no. 2 83–104.
- [12] H. Miura et al., *Characterization of scanning orientation and lateral response artifact for ebt4 gafchromic film*, *Journal of Applied Clinical Medical Physics* **24** (2023), no. 8 e13992.
- [13] G. P. Dimri et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92** (1995), no. 20 9363–9367.
- [14] D. A. Gewirtz et al., *Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation*, *Biochemical pharmacology* **76** (2008), no. 8 947–957.