



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS**

**MODELO EXPERIMENTAL PRECLÍNICO DE FRACCIONAMIENTO DE  
IRRADIACIÓN CON FOTONES PARA LA INDUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE  
RADIO-OSTEOPOROSIS**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)**

**PRESENTA:  
EFRÉN HERNÁNDEZ RAMÍREZ**

**TUTOR PRINCIPAL:  
DR. LUIS ALBERTO MEDINA VELÁZQUEZ  
INSTITUTO DE FÍSICA-UNAM, INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**COTUTORA:  
DRA. JANETH SERRANO BELLO  
LABORATORIO DE BIOINGENIERÍA DE TEJIDOS, FACULTAD DE  
ODONTOLOGÍA-UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. GUERDA MASSILLON  
INSTITUTO DE FÍSICA-UNAM  
M. EN C. FLOR PEREGRINA HERRERA MARTÍNEZ  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## Agradecimientos institucionales

Al Instituto de Física de la UNAM por facilitarme sus instalaciones como alumno asociado.

Al Laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular del INCan por las facilidades proporcionadas para realizar este proyecto.

Al Departamento de Radioterapia del Instituto Nacional de Cancerología por permitirme realizar las irradiaciones en sus instalaciones.

Al M. en C. Manuel Aguilar Franco y al Arq. Diego Quiterio Vargas del Laboratorio Central de Microscopía del IFUNAM, por su apoyo para la adquisición de las imágenes SEM.

Al Dr. Miguel Ángel Araiza del Laboratorio de Biomateriales Dentales de la Facultad de Odontología de la UNAM por su apoyo para procesar las muestras óseas.

Al CONACyt por proporcionarme la beca para estudios de maestría.

Al proyecto DGAPA-UNAM PAPIIT-IN104919 por proporcionarme la beca para obtención del grado.

Al PAEP por el apoyo económico para asistir a congresos.

## Agradecimientos personales

A mis padres, quienes sin escatimar esfuerzo alguno realizaron muchos sacrificios por mi. No habría palabras suficientes para describir lo agradecido que estoy por todo su apoyo.

A mis amigas Laura Castañeda y Abril Salas por su apoyo, paciencia y consejos, tanto académicos como personales, durante todo este proceso.

A mis compañeros y amigos del posgrado: Abel, Azucena, Carlos, Víctor, Juan José, Edmundo, Laura, Ángel, Miguel Ángel, Brian, Lourdes y Benito.

A la QFB. Josefina y la M. en C. Itzel del Laboratorio de Física Médica del INCan, por ser tan buenas personas conmigo.

A Sandra Heranández, Osvaldo Torres, David Ramírez, Abril Ojeda y Monserrat Llaguno, por su ayuda en el proceso de irradiación.

A mis amigos del Laboratorio de Física Médica del INCan/UNAM. Por las largas horas de convivencia que hacían más ameno el trabajo.

Al Dr. Luis Alberto Medina, por ser mi asesor de tesis, su tiempo dedicado y su apoyo incondicional en este proceso.

A la Dra. Janeth Serrano por su invaluable ayuda a lo largo de todo el proyecto.

Al la Dra. Guerda Masillon por sus observaciones y el seguimiento dado a este trabajo.

A la M. en C. Flor Herrera por todo su tiempo invertido en el proceso experimental.

Trabajar con usted me dio una nueva perspectiva de nuestra comunidad y su labor.

A mis sinodales (Dra. Brandan, Dra. Poitevin, Dr. Rosado, Dra. Serrano y Dr. Medina) por el tiempo dedicado a este trabajo, sin duda con sus correcciones logré mostrar la mejor versión de este trabajo.



# Índice general

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Lista de abreviaturas</b>   | <b>1</b>  |
| <b>Resumen</b>   | <b>2</b>  |
| <b>1. Introducción</b>   | <b>4</b>  |
| 1.1. El hueso y sus componentes . . . . .  | 4         |
| 1.2. El cáncer y su tratamiento . . . . .  | 8         |
| 1.3. Radioterapia y sus efectos en hueso . . . . .   | 9         |
| <b>2. Antecedentes</b>   | <b>12</b> |
| 2.1. Objetivos . . . . .   | 17        |
| <b>3. Materiales y Métodos</b>   | <b>18</b> |
| 3.1. Diseño Experimental . . . . .   | 18        |
| 3.2. Verificación de distribución de Dosis . . . . .   | 19        |
| 3.2.1. Calibración de Película Radiocrómica . . . . .  | 20        |
| 3.2.2. Verificación de la Distribución de Dosis . . . . .  | 22        |
| 3.3. Irradiación en el Modelo Animal . . . . .   | 24        |
| 3.4. Adquisición y Análisis de Imágenes de microCT . . . . .   | 26        |
| 3.4.1. Curva Patrón de Concentración de Hidroxiapatita ([HA]) en<br>Función del Valor de Píxel . . . . . | 26        |
| 3.4.2. Análisis de Imágenes microCT <i>in vivo</i> . . . . .   | 28        |
| 3.5. Análisis <i>ex vivo</i> . . . . .   | 29        |
| 3.5.1. Adquisición y Análisis de Imágenes de Microscopía SEM . . . . .                                   | 29        |
| 3.5.2. Histología . . . . .  | 30        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.6. Análisis Estadístico . . . . .                     | 31        |
| <b>4. Resultados</b>                                    | <b>32</b> |
| 4.1. Verificación de la Distribución de Dosis . . . . . | 32        |
| 4.2. Estudios microCT <i>in vivo</i> . . . . .          | 34        |
| 4.3. Imágenes de Microscopía SEM . . . . .              | 38        |
| 4.4. Estudio Histológico (Experimento B) . . . . .      | 46        |
| <b>5. Discusión</b>                                     | <b>50</b> |
| <b>6. Conclusión</b>                                    | <b>55</b> |
| <b>Bibliografía</b>                                     | <b>55</b> |



# Lista de abreviaturas

|         |                                       |
|---------|---------------------------------------|
| [HA]    | Concentración de hidroxiapatita       |
| SEM     | Secondary electron microscopy         |
| DMO     | Densidad mineral ósea                 |
| fx      | Fracción                              |
| microCT | Microtomografía computarizada         |
| BV      | Volumen de hueso                      |
| TV      | Volumen total de la región de interés |
| Tb.Th   | Grosor trabecular                     |
| Tb.Sp   | Espacio trabecular                    |
| Tb.N    | Número trabecular                     |
| BV/TV   | Fracción volumétrica de hueso         |
| BA      | Área de hueso                         |
| TA      | Área total de la región de interés    |
| B.Pm    | Perímetro del hueso trabecular        |
| BA/TA   | Fracción superficial de hueso         |
| BED     | Biologically effective dose           |
| ANOVA   | Analysis of variance                  |
| netOD   | Densidad óptica neta                  |
| VP      | Valor de píxel                        |

# Resumen

El hueso es uno de los tejidos más afectados durante los tratamientos de radioterapia. Se ha reportado que la incidencia de fracturas después de un tratamiento de radioterapia en pacientes con cánceres ginecológicos es del 14 %; además de un incremento del 76 % del riesgo de fractura en cadera para pacientes que reciben radioterapia como tratamiento para cáncer de próstata en comparación con los que se les realizó prostatectomía radical. Pese a que las nuevas tecnologías permiten reducir el daño por radiación en el tejido sano, hasta la fecha, no existe una solución curativa para esta pérdida ósea inducida por la radiación, esta situación plantea la necesidad de desarrollar modelos preclínicos que permitan evaluar el proceso de inducción de la radio-osteoporosis y formas de minimizarlo.

En este trabajo se evaluó el daño producido en tejido óseo tras la irradiación de la región pélvica de ratas *Wistar* adultas con un haz de fotones de 6 MV. Se evaluaron cuatro esquemas de irradiación de dos fracciones, con dosis totales de 4, 8, 12 y 16 Gy, y un esquema de cuatro fracciones, con dosis total de 16 Gy. Se obtuvieron imágenes de microCT a los dos y cuatro meses después de las irradiaciones en un experimento, y a las 3 y 7 semanas postirradiación para el otro experimento, con el fin de evaluar cambios en la concentración de hidroxapatita [HA] en la cadera y la cabeza femoral. Después de la obtención de imágenes, los animales se sacrificaron y se extrajeron los huesos del fémur para realizar estudios histológicos y de microscopía electrónica de barrido para evaluar cambios en la microarquitectura del hueso trabecular.

A los dos meses posterior a las irradiaciones, en el primer experimento se observó

una disminución del 25 % de [HA] en la cabeza femoral con respecto al control, en todos los grupos irradiados. En la cadera, se observó una reducción del 30 % de [HA] después de cuatro meses. El análisis morfométrico 2D con imágenes de microscopía SEM (técnica estereológica) obtuvo resultados congruentes con lo observado en trabajos previos. Entre el control y el grupo prescrito a 12 Gy se observó un aumento aproximado en el grosor trabecular del 40 % ( $p < 0.05$ ) y disminución de aproximadamente 30 % en el número trabecular.

En el segundo experimento, no se observaron diferencias significativas (irradiadas vs. control) en términos de [HA]. Este resultado se asoció al hecho de que eran ratas jóvenes en el momento de las irradiaciones, pues se sabe que la reparación del daño por radiación en el tejido óseo es más eficiente en ratas jóvenes que en ratas adultas. Sin embargo, histológicamente se ven cambios. De igual manera, no se obtuvieron resultados concluyentes en los parámetros morfométricos.

Los esquemas de irradiación fraccionados resultaron en daño óseo, lo cual se puede asociar con la inducción de radio-osteoporosis. Es necesario aumentar el tamaño muestral de los grupos en los que se observó claramente el efecto de la radiación para corroborar la tendencia de los datos. Además se está trabajando en diferentes técnicas de análisis de imágenes para cuantificar de manera más eficiente el daño en la microarquitectura ósea.

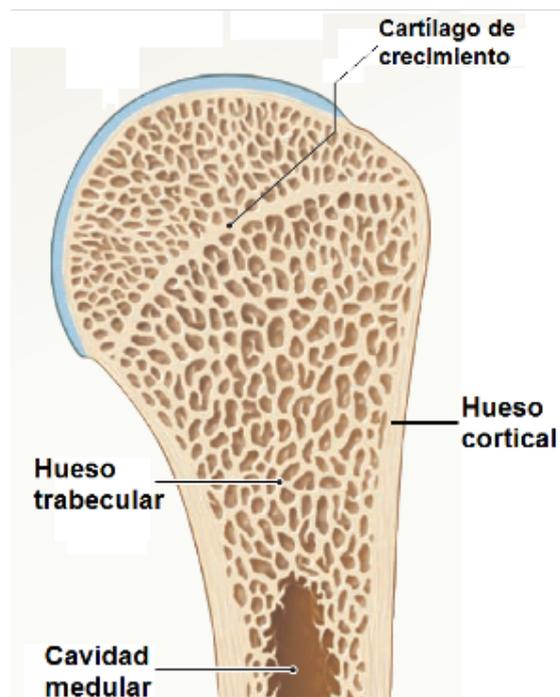
# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. El hueso y sus componentes

Los huesos están compuestos por materia orgánica e inorgánica. La materia inorgánica representa, aproximadamente, dos tercios de la masa del hueso y está compuesta por fosfatos e hidróxidos de calcio, los cuales interactúan para formar cristales de hidroxiapatita. La materia orgánica está compuesta por células, vasos sanguíneos y sustancia intercelular, principalmente colágena, la cual puede impregnarse completamente de sales de calcio sin que las células mueran al endurecerse dicha sustancia. El osteoide es la porción orgánica sin mineralizar de la matriz ósea y está compuesta principalmente de colágena tipo I [1, 2].

Las funciones principales del sistema óseo son proporcionar soporte estructural al cuerpo, dar protección a los órganos vitales, proporcionar un entorno para la médula y fungir como reserva de calcio y fosfatos. Los huesos están compuestos por dos tipos de tejido: una capa externa dura llamada hueso cortical (o compacto) y una capa interna de hueso trabecular (o esponjoso) constituido por una serie de laminillas o trabéculas que delimitan espacios comunicados entre sí, ocupados por médula ósea (ver Figura 1.1) [3, 4].

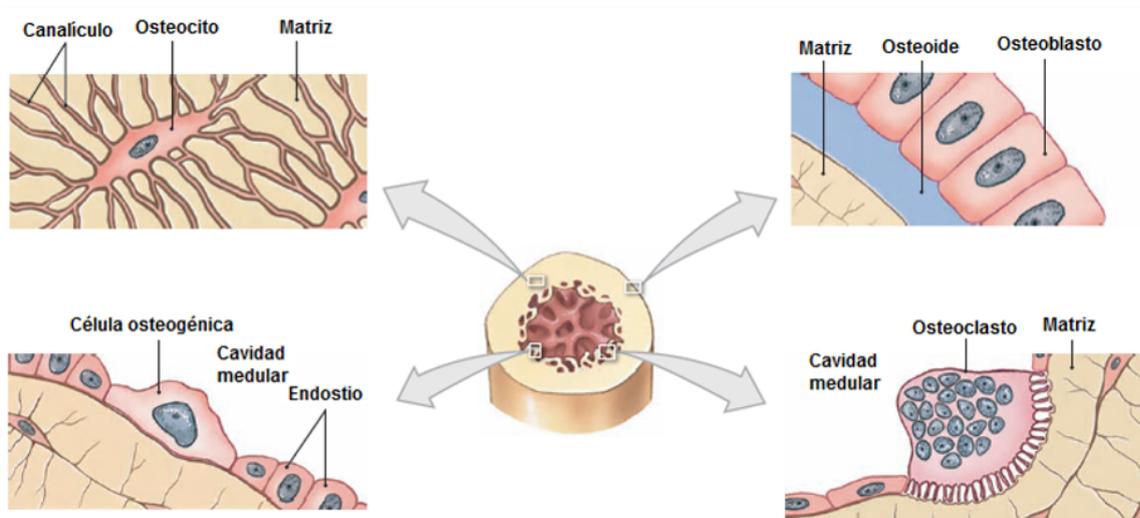


**Figura 1.1:** Representación esquemática del hueso (húmero proximal), en el cual se muestran los dos tipos de hueso: trabecular y cortical [2]

Las células que constituyen los huesos son responsables de la producción, mantenimiento y modelado óseo, e incluyen (ver Figura 1.2):

- **Osteoblastos:** producen nueva matriz ósea en un proceso llamado osificación u osteogénesis, además producen y liberan las proteínas y otros componentes orgánicos de la matriz. Antes del depósito de las sales de calcio, esta matriz orgánica se conoce como osteoide. Los osteoblastos ayudan a aumentar las concentraciones locales de fosfato de calcio por encima de su límite de solubilidad, lo que desencadena el depósito de sales de calcio en la matriz orgánica. Este proceso convierte el osteoide en hueso [2, 3].
- **Células osteogénicas:** células troncales que se dividen para producir células hijas que se diferencian en osteoblastos. Mantienen la población de osteoblastos y son importantes en la reparación de una fractura o grieta en un hueso. Se encuentran en una capa interna, o endostio, que recubre las cavidades medulares y los pasajes de los vasos sanguíneos que penetran en la matriz del hueso compacto [2].

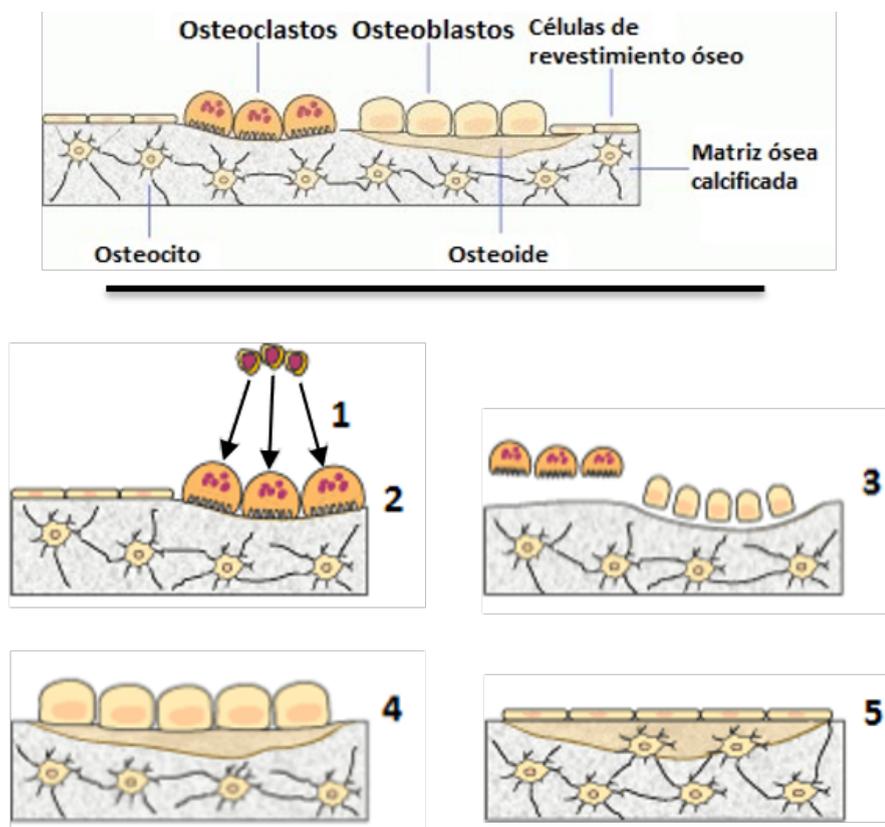
- **Osteocitos:** son osteoblastos que se incorporan dentro del osteoide recién formado, que eventualmente se convierte en hueso calcificado. Los osteocitos situados en las profundidades de la matriz ósea mantienen el contacto con los osteocitos recién incorporados en el osteoide, los osteoblastos y las células del revestimiento superficial óseo a través de una extensa red de pequeños conductos, conocidos como canaliculos, que permiten la comunicación intracelular y extracelular, facilitando el paso de nutrientes y señales bioquímicas [3].
- **Osteoclastos:** células multinucleadas que derivan del linaje hematopoyético. Son responsables de la resorción del tejido óseo, proceso por el cual se disuelve la hidroxiapatita y da como resultado la reincorporación de calcio y fosfatos óseos hacia la sangre. Se encuentran unidos a la superficie del hueso en sitios de resorción ósea activa [2, 3].



**Figura 1.2:** Principales componentes del hueso a nivel celular y su localización [2].

El modelado óseo se produce cuando la resorción y la formación de hueso ocurren en superficies separadas. Este proceso ocurre durante el nacimiento hasta la edad adulta y es el responsable de la ganancia de masa ósea y cambios en la forma esquelética. Por otro lado, la remodelación es la sustitución de tejido óseo viejo por nuevo, y ocurre en el esqueleto del adulto para mantener su masa ósea. Este proceso implica el acoplamiento de la formación y la resorción ósea y consta de cinco fases (ver Figura 1.3) [3]:

1. Activación: se estimulan los preosteoclastos y se diferencian bajo la influencia de citosinas y factores de crecimiento a osteoclastos maduros y activos.
2. Resorción: los osteoclastos digieren la matriz mineral, es decir, el hueso viejo.
3. Reversión: se posicionan células mononucleares sobre la superficie del hueso. Estas células preparan la superficie para que nuevos osteoblastos formen el hueso y proporcionan señales para la diferenciación y migración de los osteoblastos.
4. Formación: los osteoblastos sintetizan una nueva matriz ósea.
5. Quiescencia: los osteoblastos se convierten en células de revestimiento de hueso en reposo sobre la superficie ósea recién formada.



**Figura 1.3:** Representación gráfica del proceso de remodelación ósea [3]

## 1.2. El cáncer y su tratamiento

El cáncer es una alteración del comportamiento celular causada por numerosas mutaciones genéticas y anomalías en la producción y funcionamiento de las proteínas. Las anomalías específicas varían mucho, según el tipo de cáncer y el tipo de tejido del que se originó. Por lo tanto, no hay una sola descripción de cáncer, dado que no es una sola enfermedad; es en realidad, una clase de enfermedades relacionadas con el crecimiento celular ilimitado que es potencialmente fatal para el organismo en el que se desarrolla [5].

El tratamiento contra el cáncer es una serie de intervenciones, que incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia y en ocasiones la inmunoterapia, que tiene como objetivo curar la enfermedad o prolongar la vida del paciente considerablemente, así como mejorar su calidad de vida. El esquema de tratamiento implementado depende del tipo de cáncer y en qué etapa se encuentra. En la mayoría de los casos se usa una combinación de las estrategias anteriormente mencionadas [6].

La radioterapia usa altas dosis de radiación ionizante para dañar las células cancerosas y reducir los tumores. Lo anterior es posible porque la radiación ionizante es capaz de dañar a las células y retrasar su crecimiento al dañar su ADN y/o algunas otras estructuras, como la membrana plasmática y las mitocondrias. Adicionalmente, las células cancerosas se multiplican en mayor medida que las células normales, lo cual las hace más radiosensibles [7, 8, 9]. En la radioterapia de haz externo, la radiación proviene de una fuente externa al cuerpo, como un acelerador lineal (Linac) o un irradiador de  $^{60}\text{Co}$ , que dirige el haz a la zona del tumor. Es un tratamiento local, lo que significa que se irradian partes específicas del cuerpo. El principal objetivo de la radioterapia externa es depositar una dosis de radiación alta en una región tumoral delimitada causando el menor daño posible al tejido sano [9].

El desarrollo tecnológico de los últimos años ha permitido mejoras en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer, las cuales han ayudado a aumentar la tasa de supervivencia del cáncer a largo plazo [8, 9]. Por ejemplo, un estudio realizado con datos de población estadounidense entre 2003 y 2009, reportó en 2017 una tasa de supervivencia a 5 años del 96.9% para pacientes con cáncer de próstata [10].

### 1.3. Radioterapia y sus efectos en hueso

La radioterapia externa es un tratamiento ampliamente usado en pacientes con cáncer; aproximadamente dos tercios de los pacientes con neoplasias malignas sólidas reciben radioterapia como parte de su tratamiento. Durante estos tratamientos, el hueso es frecuentemente expuesto a la radiación, lo que puede provocar la pérdida de la función medular y disminución de la densidad ósea, elevando el riesgo de sufrir una fractura [11]. De esta forma, la radioterapia puede inducir una disminución en la densidad mineral ósea (DMO) y/o una alteración en la microarquitectura del hueso, además de daños en médula y el tejido hematopoyético.

Pese a que existen técnicas, como la radioterapia de intensidad modulada, que permiten restringir la dosis recibida en tejido (hueso) sano, prevalecen efectos que impactan en la calidad de vida de los pacientes. El mecanismo subyacente del daño al tejido esquelético inducido por la radiación ionizante aún no es del todo claro. Se sabe que posterior a la irradiación, en el hueso se puede presentar edema perivascular, hemorragia de vasos pequeños, disminución de la perfusión y eventualmente fibrosis intimal, produciendo estrechamiento del vaso y una posterior oclusión vascular [12, 13]. El tiempo que tardan en presentarse estos eventos y qué tan graves sean depende de la dosis, y aunque el flujo sanguíneo puede eventualmente restaurarse con el tiempo, puede presentarse una reducción permanente en la masa ósea y la densidad ósea general [6].

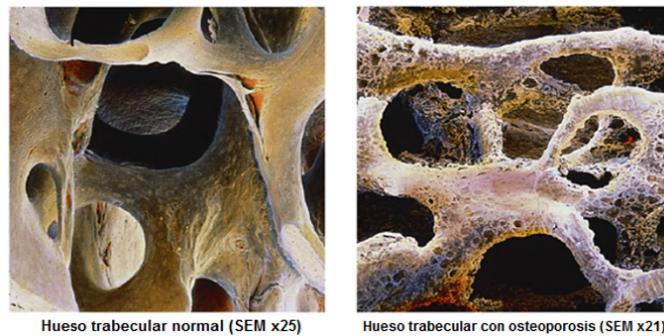
A medida que una persona envejece, la médula ósea normal experimenta una con-

versión gradual de médula roja a amarilla, progresa desde las extremidades hasta el esqueleto axial y termina entre la segunda y la tercera década. Sin embargo, muchas regiones dentro del esqueleto, incluida la pelvis ósea, la columna vertebral y las metáfisis proximales de los huesos largos conservarán la médula roja [15]. Estos sitios esqueléticos que retienen la médula roja son más susceptibles a los efectos de la radiación, ya que las células mitóticamente activas son más sensibles a los efectos perjudiciales de la radiación. Entonces, la alta tasa mitótica de la médula roja hematopoyética hace que estos sitios esqueléticos sean más vulnerables. La fibrosis de la médula puede desarrollarse después de exposiciones a radiación únicas, repetidas o crónicas, y una dosis de 40 Gy puede afectar permanentemente la capacidad de la médula para soportar la hematopoyesis normal [16, 17].

Se sabe que casi inmediatamente después de la irradiación se presenta una reducción en el número de osteoblastos [18, 19]. Por otro lado, los efectos de la radiación ionizante sobre los osteoclastos aún son variables; sin embargo, un resultado es constante, el hueso muestra un mayor número y actividad de osteoclastos en comparación con los osteoblastos, lo que da como resultado una mayor resorción ósea y un mayor recambio óseo trabecular, similar a la osteoporosis [19, 20].

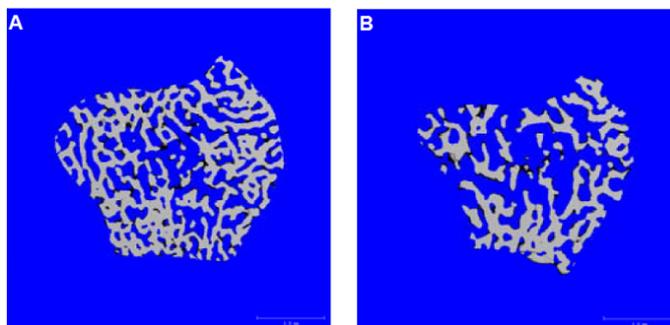
La OMS (2007) ha establecido que se padece osteoporosis cuando la medida de la DMO es menor o igual a -2.5 desviaciones estándar respecto de la media de adultos jóvenes. Esta medida se determina con una absorciometría de rayos X de energía dual (DXA) en columna lumbar y en cuello femoral. Actualmente, dicha definición ha quedado superada, ya que sólo considera la DMO para determinar el daño óseo y deja de lado aspectos relevantes asociados con la microarquitectura trabecular [21, 22].

En la Figura 1.4 se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de hueso trabecular sano y con osteoporosis debida a una edad avanzada del sujeto. Es claro el daño del hueso de la derecha que se muestra poroso respecto al hueso trabecular normal.



**Figura 1.4:** Imágenes SEM de hueso trabecular de un adulto joven (izquierda) y de un adulto mayor con osteoporosis (izquierda) [2]

En la Figura 1.5 se muestran cortes axiales de imágenes de microtomografía computada (microCT) de la región proximal de la tibia de una rata no irradiada y la imagen de la misma región ósea dos semanas después de haber realizado una irradiación con dosis total de 16 Gy, en cuatro fracciones iguales (fx). Se observa una alteración de la estructura trabecular del hueso debido a la irradiación [23].



**Figura 1.5:** Corte axial de imágenes microCT de tibia de rata. No irradiada (A) e irradiada en zona pélvica con una dosis total de 16 Gy (4 fracciones) [23]

Si bien las tasas de fractura dependen de la dosis de radiación y de la zona del esqueleto que es irradiado, el aumento del riesgo de fractura es un efecto secundario significativo de la radioterapia con un gran impacto en la calidad de vida del paciente, especialmente en aquellos con neoplasias pélvicas y torácicas [11].

# Capítulo 2

## Antecedentes

La radioterapia es uno de los procedimientos ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer; sin embargo, los efectos secundarios asociados imponen una limitante a su uso. Un análisis presentado en 2019 en el que se evaluaron 3,929 casos, obtenidos de trabajos publicados en el periodo que comprende de 1980 a 2018 (siendo el 62 % correspondiente a publicaciones del 2013 en adelante), reportó una incidencia de fractura por insuficiencia pélvica posterior a la radioterapia para pacientes con cánceres ginecológicos[24]. A su vez, un estudio realizado con 45,662 pacientes con cáncer de próstata determinó que la radioterapia de haz externo aumenta significativamente el riesgo de fracturas de cadera en un 76 % respecto a pacientes a los que se les realizó prostatectomía radical [25].

A la fecha se han realizado diversos estudios, *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, para conocer los efectos de la radiación ionizante en el tejido esquelético y sus causas [11, 14, 23, 26, 27]. Por ejemplo, estudios realizados en ratones mostraron que la radiación indujo una disminución en la fracción de volumen de hueso trabecular en la región proximal de la tibia, a partir de las dos semanas posteriores a la irradiación, la cual persistió durante un periodo de 2 a 3 meses posteriores a la exposición de los animales al campo de radiación. Los mismos estudios muestran resultados de histomorfometría ósea y análisis de química sanguínea que sugieren como causas más probables de la pérdida ósea, la disminución de la actividad de los osteoblastos y el aumento en la actividad de los osteoclastos [28].

Algunos estudios sugieren que existe una estimulación temprana de la resorción ósea, es decir actividad osteoclástica, después de la exposición, que podría contribuir a la causa del daño óseo inducido por la radiación [29, 33]. A partir de la evidencia mostrada por los estudios preclínicos, existe la posibilidad de que un aumento temprano inducido por la radiación en la actividad de los osteoclastos pueda contribuir a la pérdida de la densidad ósea observada como efecto tardío de la radioterapia. Hay evidencia clínica que puede respaldar esta pérdida ósea rápida y aguda, ya que se ha observado una reducción en la densidad mineral ósea volumétrica en las vértebras lumbares de pacientes con cáncer de cérvico uterino, 5 semanas después de que el hueso se expusiera a una dosis total de 22.5 o 45 Gy de fotones de alta energía, sin recuperación posterior un año después [30].

Se ha publicado una vasta cantidad de trabajos preclínicos relacionados con modelos de osteoporosis, dentro de los cuales los más estudiados son: la osteoporosis postmenopáusica inducida por ovariectomización, la asociada al desuso y la inducida por glucocorticoides [31]. En estos trabajos se analiza la densidad mineral ósea y la calidad de hueso para determinar la existencia de daño en el tejido óseo, para lo cual se usan diversas técnicas y parámetros; dentro de esta variedad se observa que los más comunes son los parámetros de morfometría ósea trabecular [32, 33, 34].

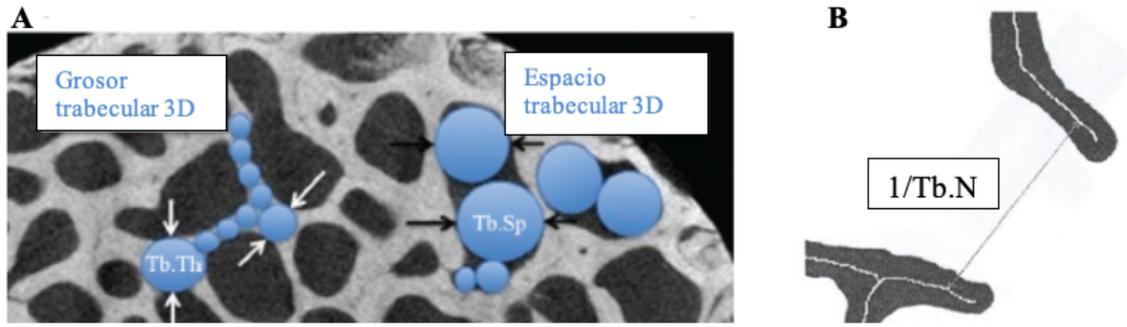
La morfometría ósea cuantitativa es un método para evaluar las propiedades estructurales de las trabéculas en el hueso esponjoso. La morfometría trabecular anteriormente se evaluaba en dos dimensiones, en las que los parámetros estructurales se inspeccionaban visualmente o se medían a partir de secciones, y se infería el valor de los parámetros en tres dimensiones sobre la base de la estereología. Una limitante particular de la morfometría realizada en dos dimensiones es la naturaleza destructiva del procedimiento, lo que impide que la muestra se utilice para otras mediciones, como podría ser el análisis en diferentes planos. Este último es muy deseable debido a la naturaleza anisotrópica del hueso esponjoso [35].

Es por esto que se han desarrollado técnicas que permiten el análisis morfométrico directamente en tres dimensiones. A continuación, se describen algunos parámetros morfométricos de interés para este trabajo [36, 37]:

- Volumen de hueso (BV): volumen que ocupa el hueso (BV) en el volumen total de la región de interés (TV).
- Grosor trabecular (Tb.Th): Medida promedio del grosor de las trabéculas. Se reporta en micrómetros.
- Espacio trabecular (Tb.Sp): Medida promedio de los espacios que contienen la médula ósea. Se reporta en micrómetros.
- Número trabecular (Tb.N): Es el número de trabéculas por unidad de longitud. Tiene unidades de  $\text{mm}^{-1}$ .

En el análisis morfométrico 3D, todas las medidas de parámetros se realizan directamente del volumen reconstruido de las imágenes de microCT. La superficie de hueso es calculada usando un método de “marching cubes”, el cual se realiza colocando triángulos sobre la superficie del hueso. El volumen de hueso (BV) es calculado utilizando tetraedros construidos en la superficie del triángulo y el volumen total (TV) a partir del conteo de voxels. Para comparar muestras con diferentes tamaños se usan índices estandarizados como la fracción de volumen de hueso (BV/TV). El grosor trabecular es calculado usando esferas que se ajustan a la estructura de la trabécula mientras que el cálculo del espacio trabecular se realiza usando el mismo principio que para Tb.Th, pero ahora sobre los voxels que contienen la médula ósea (Figura 2.1). El parámetro Tb.N se calcula como el inverso de la distancia entre las líneas centrales del hueso trabecular (Figura 2.1 B) [36].

Como se mencionó anteriormente, los parámetros de morfometría ósea se pueden obtener usando imágenes 2D y técnicas estereológicas, con la suposición de que las trabéculas tienen una estructura de placas o cilíndricas. Para esto, de la imagen bidimensional, se mide el área de hueso (BA) y su perímetro (B.Pm) así como el



**Figura 2.1:** Esquema del cálculo de parámetros morfométricos 3D [36]

área total de la ROI (TA) [36, 38], a partir de estos valores es posible calcular los parámetros de la siguiente manera:

$$Tb.Th = \frac{4}{B.Pm/BA} \quad (2.1)$$

$$Tb.N = \frac{\sqrt{\frac{4}{\pi} \left(\frac{BA}{TA}\right)}}{Tb.Th} \quad (2.2)$$

$$Tb.Sp = Tb.Th \left( \sqrt{\frac{4}{\pi} \left(\frac{BA}{TA}\right)} - 1 \right) \quad (2.3)$$

Este método de morfometría comparada con la “medición directa” con imágenes 3D ha mostrado ser un buen estimador de los parámetros; sin embargo, los resultados obtenidos deben de ser tomados con precaución. Uchiyama et al [39] compararon parámetros de morfometría trabecular evaluados con histología (2D) y microCT (3D) en la misma muestra de ilion humano; mostraron que BV/TV, Tb.N and Tb.Th medidos con histomorfometría presentaron una mejor correlación con los obtenidos con microCT.

En un estudio realizado en 2008, Willey reportó un protocolo experimental para la inducción de osteoporosis por radiación en la región pélvica de ratas, en el que posteriormente se evaluó la administración de un antirresortivo como posible tratamiento de la osteoporosis [23]. En dicho trabajo se implementó un protocolo de irradiación, basado en el cálculo de la dosis biológicamente efectiva (BED), que modela la expo-

sición a la radiación de la cadera de una paciente durante el tratamiento de cáncer cérvico uterino. La BED indica cuantitativamente el efecto biológico de cualquier esquema de fraccionamiento usado en radioterapia, teniendo en cuenta los cambios en la dosis por fracción, la dosis total y el tiempo global de tratamiento, además de la sensibilidad al fraccionamiento de las células determinado por el cociente  $\alpha/\beta$  [40, 41].

En el trabajo de Willey [23], para el cálculo del fraccionamiento en un estudio preclínico en ratas se consideró un tratamiento de cáncer cervicouterino, con dosis total prescrita al tumor de 54 Gy, en 30 fracciones de 1.8 Gy cada una (lunes a viernes durante 6 semanas); se estimó que al menos una región de la cadera recibe aproximadamente el 50% de la dosis por fracción (0.9 Gy), 27 Gy al final del tratamiento. Para el cálculo de la BED se supuso que el cociente  $\alpha/\beta$  es igual a 3 Gy tanto en hueso de humano adulto como en rata; considerando la dosis recibida en el hueso se obtuvo una BED de 35.1 Gy para el tratamiento de cáncer cervicouterino. Esta irradiación en humanos fue modelada por una una dosis total de 16 Gy, en 4 fracciones de 4 Gy cada una, resultando en una BED de 36.8 Gy para el modelo animal, lo cual indica que el efecto biológico en el modelo preclínico será similar al que se presenta en la región de hueso irradiada en un paciente. Es importante resaltar que suponer que el cociente  $\alpha/\beta$  es el mismo para hueso de rata adulta y de humano no está bien fundamentado y tiene poca validez. Sin embargo, desde entonces se utiliza por diferentes investigadores como una aproximación (estimación) al no contar con datos experimentales [23].

En resumen, la radioterapia ha demostrado ser una modalidad de tratamiento efectiva para el cáncer; aproximadamente dos tercios de los pacientes con neoplasias malignas reciben radioterapia como parte de su tratamiento [42]. Es bien sabido que el tejido óseo es uno de los más afectados durante un tratamiento de radioterapia en pacientes de cáncer ginecológicos y de cáncer de próstata. Pese a que las nuevas tecnologías permiten reducir el daño por radiación al tejido sano, hasta la fecha no existe una solución curativa para esta posible pérdida ósea inducida por la radiación.

Esta situación sustenta la necesidad de desarrollar modelos preclínicos de radioterapia que permitan evaluar posibles tratamientos contra la radio-osteoporosis.

## 2.1. Objetivos

### General

Determinar un esquema de fraccionamiento de irradiación con un Linac de 6 MV en rata *Wistar* adulta para la evaluar la inducción de osteoporosis en tejido óseo de la región pélvica.

### Específicos

- Establecer un método de irradiación de la región pélvica de ratas adultas *Wistar*.
- Evaluar los cambios en la concentración de hidroxapatita y en la microarquitectura ósea, como resultado de las irradiaciones.

# Capítulo 3

## Materiales y Métodos

### 3.1. Diseño Experimental

Se utilizaron ratas macho y hembra de la cepa *Wistar* provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los procedimientos con animales de experimentación se apegaron a las regulaciones y especificaciones técnicas de la NOM-062-ZOO-1999 y al protocolo 027-CIC-2019 aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina, UNAM con el fin de reducir el sufrimiento de los animales y minimizar el número de especímenes durante los experimentos. Los animales se alojaron en el Bioterio del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) con control de temperatura (25-28°), humedad relativa (40-60%) y fotoperiodo luz/oscuridad de 14/10 horas, y se alimentaron e hidrataron *ad libitum*. Se establecieron dos experimentos (A y B) de irradiación en zona pélvica. En el **Experimento A** se utilizaron ratas macho (n = 11 total) con un peso de 450-500 g; éstas se dividieron en un grupo control (n = 2) no irradiado y tres grupos que fueron irradiados, diariamente, en esquemas de dos fracciones (Tabla 3.1). En el **Experimento B** se utilizaron ratas hembra (n = 23 total) con un peso de 220-250 g, divididas en: grupo control (no irradiadas) (n = 3) y cuatro grupos experimentales (n=5) que fueron irradiados diariamente hasta cumplir con el fraccionamiento (Tabla 3.2).

**Tabla 3.1:** Irradiaciones realizadas para el Experimento A

| Grupo   | n | Dosis total [Gy] | Fracciones |
|---------|---|------------------|------------|
| Grupo 1 | 3 | 4                | 2 (1/día)  |
| Grupo 2 | 3 | 8                | 2 (1/día)  |
| Grupo 3 | 3 | 12               | 2 (1/día)  |

**Tabla 3.2:** Irradiaciones realizadas para el Experimento B

| Grupo   | n | Dosis total [Gy] | Fracciones |
|---------|---|------------------|------------|
| Grupo 1 | 5 | 4                | 2 (1/día)  |
| Grupo 2 | 5 | 16               | 2 (1/día)  |
| Grupo 3 | 5 | 24               | 2 (1/día)  |
| Grupo 4 | 5 | 16               | 4 (1/día)  |

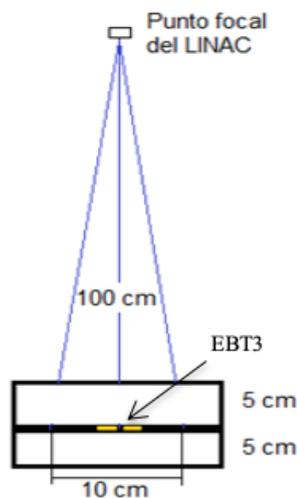
Cabe destacar que el Experimento A se planteó como un piloto; sin embargo, se presentaron resultados interesantes por lo que se decidió incluirlos en este trabajo.

### 3.2. Verificación de distribución de Dosis

Para la irradiación de los animales se utilizó un Linac Varian TrueBeam<sup>TM</sup> STx del Departamento de Radioterapia del Instituto Nacional de Cancerología. Dicho equipo cuenta con una calibración dosimétrica realizada por los físicos de ese departamento, la cual se realizó siguiendo el protocolo del OIEA TPR 398 [43]. Este equipo está diseñado para la irradiación de pacientes, por lo cual fue necesario verificar que para nuestras condiciones experimentales se cumpliera que la distribución de dosis de planificación coincidiera con la dosis impartida. La verificación dosimétrica se realizó con película radiocrómica Grafchromic<sup>TM</sup> EBT3.

### 3.2.1. Calibración de Película Radiocrómica

Para determinar la curva patrón de respuesta de la película EBT3 se irradiaron por triplicado películas de  $3 \times 3 \text{ cm}^2$  a diferentes dosis, la cuales se especifican en la Tabla 3.3. Las películas se colocaron entre placas de agua sólida de 5 cm de espesor. La irradiación se realizó en el TrueBeam™ STx, con fotones de 6 MV, una distancia fuente superficie de 100 cm (SSD, por sus siglas en inglés) y con un campo de  $10 \times 10 \text{ cm}^2$ , ver Figura 3.1.



**Figura 3.1:** Montaje experimental usado para la irradiación de las películas.

Las películas fueron escaneadas 24 horas antes y después de la irradiación usando el escáner EPSON® 11000-XL del Departamento de Radioterapia del INCa. Se colocó placa opaca sobre la cama del escáner, en la posición de calibración. El escaneo se realizó en modo transmisión a 300 ppp de resolución espacial y una profundidad de color de 48-bit.

De cada imagen se analizó una ROI en la región central de  $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$  para obtener el valor medio de píxel ( $I$ ) y desviación estándar ( $\sigma$ ). Para esto se utilizó el software libre ImageJ (v1.51j8, National Institutes of Health, Estados Unidos). Estas mediciones se realizaron sólo en el canal rojo, dado que se ha reportado que es el de mayor sensibilidad y menor incertidumbre [44, 45].

**Tabla 3.3:** Valores de dosis nominales en agua correspondientes a cada conjunto de películas

| Películas | Dosis $\pm \delta_D$ [Gy] |
|-----------|---------------------------|
| 1-3       | 0.50 $\pm$ 0.01           |
| 4-6       | 0.75 $\pm$ 0.01           |
| 7-9       | 1.00 $\pm$ 0.01           |
| 10-12     | 1.50 $\pm$ 0.02           |
| 13-15     | 2.00 $\pm$ 0.02           |
| 16-18     | 2.50 $\pm$ 0.03           |
| 19-21     | 3.00 $\pm$ 0.03           |
| 22-24     | 5.00 $\pm$ 0.06           |
| 25-27     | 10.0 $\pm$ 0.1            |
| 28-30     | 15.0 $\pm$ 0.1            |

De las películas irradiadas a la misma dosis se calculó el promedio ponderado del valor medio de pixel,  $\bar{I}$ , y su incertidumbre asociada,  $\bar{\sigma}$

$$\bar{I} = \frac{\sum_{k=1}^3 (I_k / \sigma_k^2)}{\sum_{k=1}^3 (1 / \sigma_k^2)} \quad (3.1)$$

$$\bar{\sigma} = \left( \frac{1}{\sum_{k=1}^3 (1 / \sigma_k^2)} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3.2)$$

A partir de estos valores, se calculó la densidad óptica neta (*netOD*) y su incertidumbre ( $\sigma_{netOD}$ ):

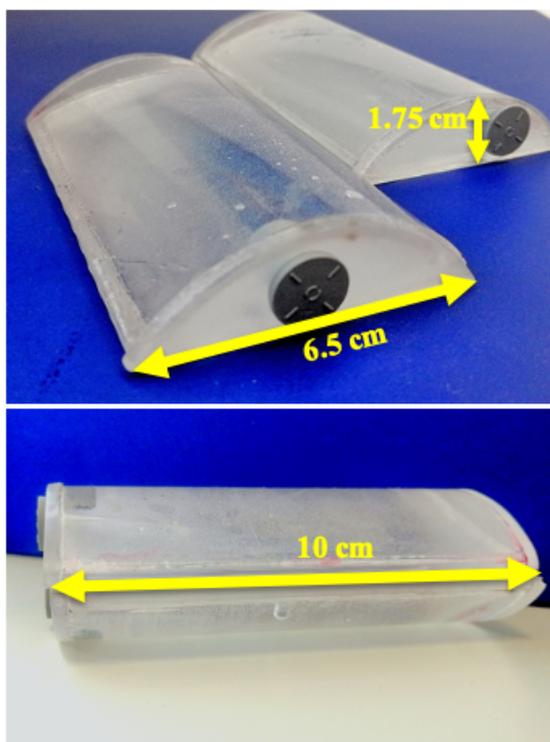
$$netOD = \log_{10} \left( \frac{\bar{I}_{unexp} - \bar{I}_{op}}{\bar{I}_{exp} - \bar{I}_{op}} \right) \quad (3.3)$$

$$\sigma_{netOD} = \frac{1}{\ln(10)} \left( \frac{(\sigma_{\bar{I}_{unexp}})^2 + (\sigma_{op})^2}{(\bar{I}_{unexp} - \bar{I}_{op})^2} + \frac{(\sigma_{\bar{I}_{exp}})^2 + (\sigma_{op})^2}{(\bar{I}_{exp} - \bar{I}_{op})^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3.4)$$

donde  $unexp$ ,  $exp$  y  $op$ , indican el valor correspondiente a una película sin exponer, expuesta y la placa opaca, respectivamente.

### 3.2.2. Verificación de la Distribución de Dosis

Para verificar la distribución de dosis en el modelo animal se diseñó un maniquí de agua, que consiste en dos semi-cilindros de acrílico, con las dimensiones (ancho y longitud) promedio de una rata de aproximadamente 12 semanas de edad y 300 g de peso. En la Figura 3.2 se muestra el maniquí y sus dimensiones. La película se colocó entre las dos partes del maniquí y el isocentro se alineó al centro geométrico.



**Figura 3.2:** Maniquí para verificación de distribución de dosis. El maniquí se compone de dos semi-cilindros huecos que se llenan de agua, entre los cuales se coloca la película radiocrómica.

Para planear la irradiación se obtuvo una imagen tomográfica del maniquí, centrado con los láseres, en un tomógrafo Siemens Somatom Sensation Open. Los parámetros de adquisición fueron: 120 kVp, 270 mAs, con protocolo de imagen para cráneo, con

corte de 1.5 mm, 250 imágenes. Posteriormente se procedió a exportar las imágenes al sistema de planeación Eclipse (v.15.3, Varian Medical Systems) para generar un plan de irradiación prescrito a 12 Gy, con cuatro campos cuadrados de 4.5 x 4.5 cm<sup>2</sup> con técnica de caja. Se procedió a irradiar el maniquí con la película dentro y con la distribución de dosis medida en la película EBT3 y la distribución generada con el sistema de planeación, se calculó el índice gamma mediante el software DoseLab® 4.11.

El índice gamma ( $\gamma$ ) es un parámetro que compara dos distribuciones de dosis, la medida (experimentalmente) y la calculada (por el sistema de planeación), el cual combina diferencias en dosis y distancia para calcular una métrica adimensional para cada punto de la distribución [42].

Para cada punto de la distribución de dosis de referencia ( $r_R$ ) se evalúa la distancia al punto evaluado ( $r_E$ ),  $\Delta r(r_R, r_E)$  y la diferencia de dosis entre los dos puntos  $\Delta D(r_R, r_E)$ .

La diferencia en dosis se calcula como:

$$\Delta D(r_R, r_E) = D_E(r_E) - D_R(r_R) \quad (3.5)$$

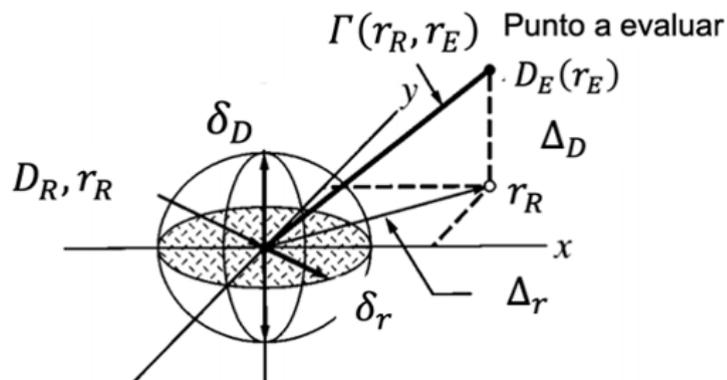
donde  $D_E(r_E)$  es la dosis en el punto  $r_E$  de la distribución de la dosis calculada, y  $D_R(r_R)$  es la dosis en el punto  $r_R$  de la distribución de referencia (medida).

Entonces para cada punto en la distribución evaluada se calcula un valor  $\Gamma$ , usando la siguiente ecuación:

$$\Gamma(r_R, r_E) = \sqrt{\frac{\Delta r^2(r_R, r_E)}{\delta_r^2} + \frac{\Delta D^2(r_R, r_E)}{\delta_D^2}} \quad (3.6)$$

donde  $\delta_r$  y  $\delta_D$  son los criterios en diferencia de distancia y dosis, respectivamente. Normalmente se reportan como  $\delta_D(\%) / \delta_r$  (mm). Desde un punto de vista geométrico la comparación  $\Gamma$  se puede interpretar como una elipsoide, definida por  $\delta_D(\%) / \delta_r$

(mm); los puntos dentro de ésta cumplen los criterios establecidos (Figura 3.3. [46, 47].



**Figura 3.3:** Esquema del principio de la verificación gamma. Modificada de [47]

Tomando el mínimo de la ecuación anterior se obtiene el índice gamma:

$$\gamma(r_R) = \text{mín} \{ \Gamma(r_R, r_E) | \forall r_E \} \quad (3.7)$$

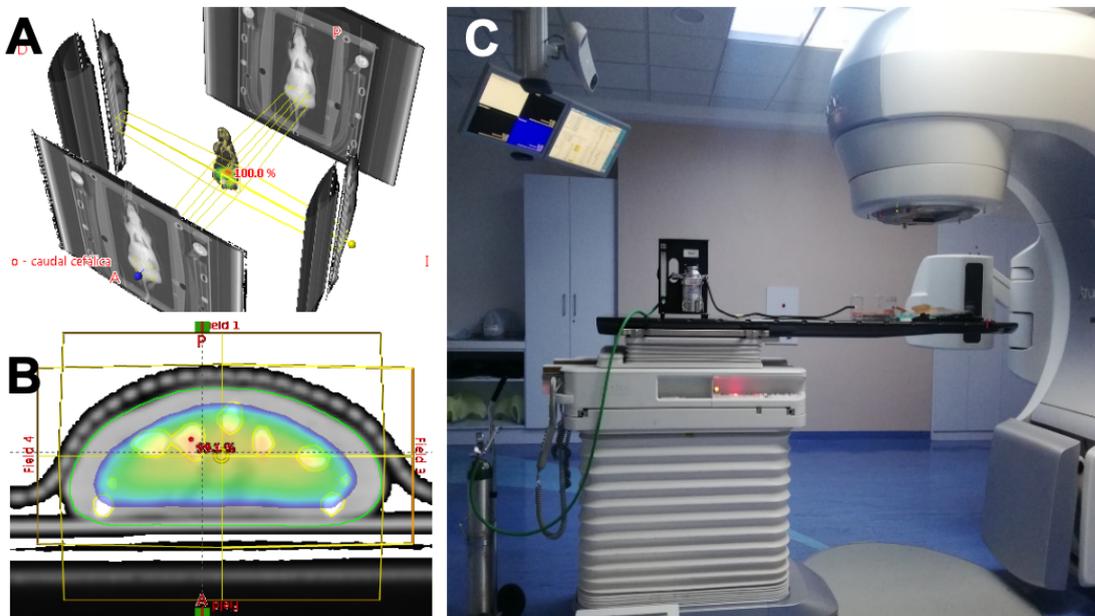
Se dice que cada punto evaluado pasa el criterio de aceptación si  $\gamma(r_R) \leq 1$ . En pruebas de control de calidad para radioterapia de intensidad modulada la prueba se considera aceptable si al menos el 95 % de los puntos comparados cumplen con el criterio de aceptación.

### 3.3. Irradiación en el Modelo Animal

- Simulación: se obtuvieron imágenes CT de cada rata con el tomógrafo Siemens Somatom Sensation Open del Departamento de Radioterapia del INCa, con los mismos parámetros descritos anteriormente para el maniquí. Se utilizó una malla de fijación (Orfit UON®, U-plast 2.4 mm Micro Plus) del tipo utilizado para irradiaciones de cráneo en pacientes, con la finalidad de reproducir el posicionamiento de la zona de irradiación.
- Planeación: se utilizó el sistema Eclipse, algoritmo de cálculo AAA, el cual es usado para planear tratamientos de pacientes con cánceres en la región pélvica.

En el Experimento A se utilizaron dos campos (anterior y posterior) de 4 x 4 cm<sup>2</sup>; En el Experimento B se usó técnica de caja, cubriendo toda la zona pélvica.

- Irradiación: las irradiaciones se realizaron en el Linac TrueBeam<sup>TM</sup> STx, se colocó la rata en la posición de referencia y se fijó con la máscara. Durante todo el proceso la rata permaneció anestesiada con isoflurano (3% en 100 % O<sub>2</sub>). Previo a la irradiación de cada animal se realizó una tomografía de haz de cono (CBCT) para corroborar que se encontrara en la posición correcta, de no ser así se corregía y se procedía con la irradiación.



**Figura 3.4:** Proceso de planeación e irradiación. A) y B) muestran imágenes del TPS, irradiaciones planeadas con técnica de caja en zona pélvica. C) Imagen del proceso de irradiación con el TrueBeam<sup>TM</sup> STx del Depto. de Radioterapia del INCAN.

### 3.4. Adquisición y Análisis de Imágenes de microCT

Las imágenes microCT se obtuvieron con el equipo micro PET/SPECT/CT Albira Ars del Laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular del Instituto Nacional de Cancerología. El módulo de CT del equipo cuenta con un tubo de rayos X de haz cónico. Para este trabajo se usó un voltaje de 45 kV y una corriente de 0.4 mA. Las imágenes en 3D se obtuvieron de la reconstrucción (por retroproyección filtrada) de las 600 proyecciones 2D obtenidas alrededor del objeto de estudio (cada 0.6°).

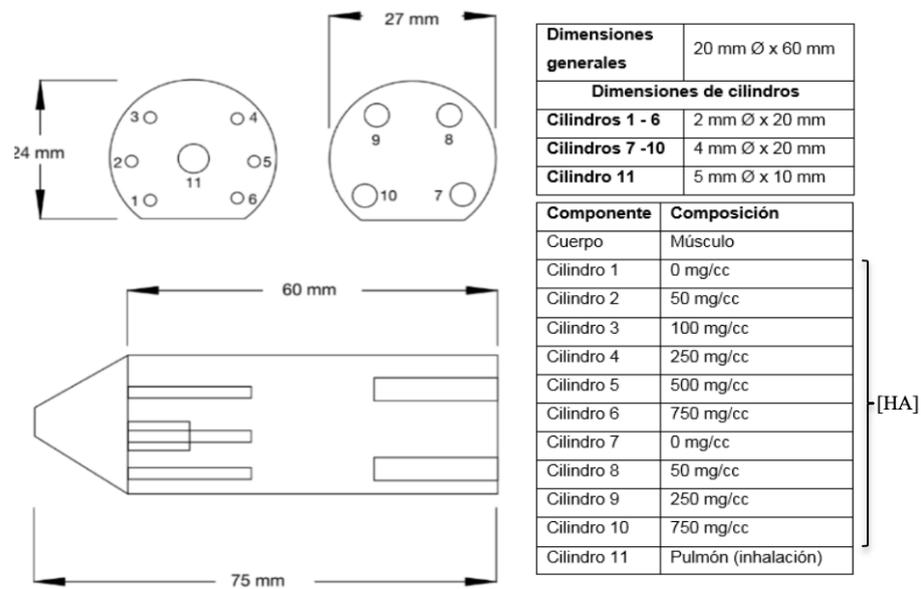
En este trabajo se analizaron imágenes crudas, las cuales definimos como aquellas que pasan por el proceso de calibración del CT, pero no se transforman a unidades Hounsfield de referencia del equipo. El proceso de calibración consiste en la adquisición de dos imágenes previas a la del objeto de estudio. La calibración se realiza aplicando la siguiente ecuación:

$$I_{raw} = -\ln \left[ \frac{I_0 - I_{dark}}{I_{flat} - I_{dark}} \times [I_{flat} - I_{dark}] \right] \quad (3.8)$$

donde  $I_{raw}$  es la imagen cruda,  $I_0$  la imagen del objeto de estudio,  $I_{flat}$  e  $I_{dark}$  se obtienen sin el objeto de estudio, pero en las mismas condiciones; la primera en presencia del campo de radiación y la segunda sin el campo de radiación [48, 49].

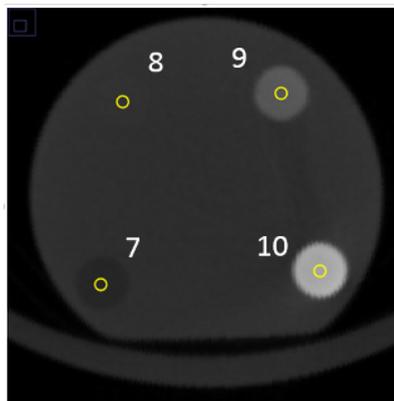
#### 3.4.1. Curva Patrón de Concentración de Hidroxiapatita ([HA]) en Función del Valor de Píxel

Se utilizó el maniquí CIRS MicroMouse™ Modelo 090 (Computerized Imaging References Systems, Inc. USA), el cual proporciona una herramienta para la cuantificación de la densidad mineral ósea, a partir de la hidroxiapatita (HA), el componente principal en los huesos de los mamíferos. El maniquí cuenta con 11 cilindros, con diferentes concentraciones conocidas de hidroxiapatita, dentro de una estructura de polímero tejido equivalente que simula la forma y tamaño de un roedor pequeño (ver Figura 3.5).



**Figura 3.5:** Esquema de dimensiones y concentraciones del maniquí CIRS MicroMouse™ Modelo 090.

A partir de las imágenes microCT del maniquí se obtuvieron los valores de píxel de la región central de los cilindros 7, 8, 9 y 10 (cilindros con grosor similar al de los huesos largos de ratas). En la Figura 3.6 se muestran las ROIs circulares de 0.875 mm Ø. Se analizaron 10 cortes de la región central de los cilindros con distintas [HA]. Se realizó un promedio de los valores de píxel obtenidos para cada cilindro y a partir de estos valores y de las concentraciones de hidroxapatita conocidas se obtuvo la curva patrón ([HA] vs. Valor de píxel).



**Figura 3.6:** Corte axial del maniquí en la región central de los cilindros 7, 8, 9 y 10, que muestra las ROIs seleccionadas.

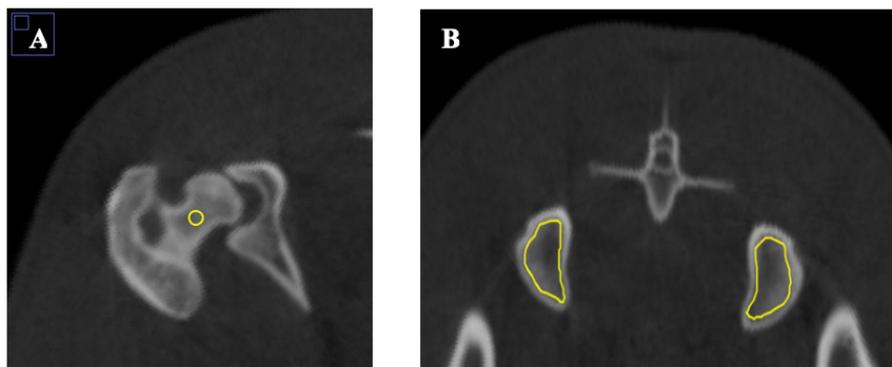
### 3.4.2. Análisis de Imágenes microCT *in vivo*

Se adquirieron imágenes microCT de la región pélvica de las ratas en los tiempos establecidos después de la irradiación. De estas imágenes se obtuvieron los valores de píxel de las regiones de hueso trabecular del cuello de cabeza de fémur y la cadera, de ambos lados, derecho e izquierdo. En la Figura 3.7 se muestra la sección de la cadera, en varios cortes, que fue analizada.



**Figura 3.7:** A) Reconstrucción 3D, la línea amarilla representa la sección de la cadera que fue analizada. B) y C) muestran la misma región en cortes coronal y sagital, respectivamente.

En la Figura 3.8 se muestran cortes axiales de una de las ratas y las ROIs definidas para obtener el valor de píxel promedio de cada región, dichas ROIs se propagaron a cuatro cortes. Con el valor de píxel se estimó la concentración de hidroxapatita, a partir de la curva patrón.



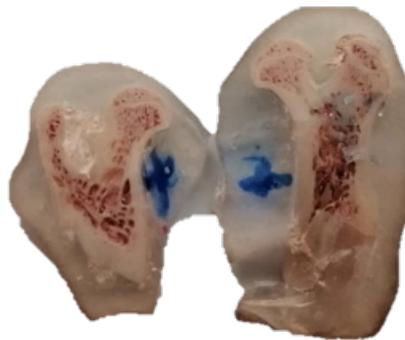
**Figura 3.8:** ROIs definidas en ambas regiones de estudio: cuello de cabeza de fémur (A) y cadera (B).

### 3.5. Análisis *ex vivo*

#### 3.5.1. Adquisición y Análisis de Imágenes de Microscopía SEM

Los animales fueron sacrificados al finalizar los estudios de imagen mediante exposición a  $\text{CO}_2$ . Se extrajeron ambos fémures y se colocaron en formol al 10 % durante 24 horas para su fijación.

El fémur derecho se fijó dentro de PMMA y posteriormente se cortó a la mitad y se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de barrido en el Microscopio SEM JOEL 5600L del Laboratorio Central de Microscopía del IFUNAM.

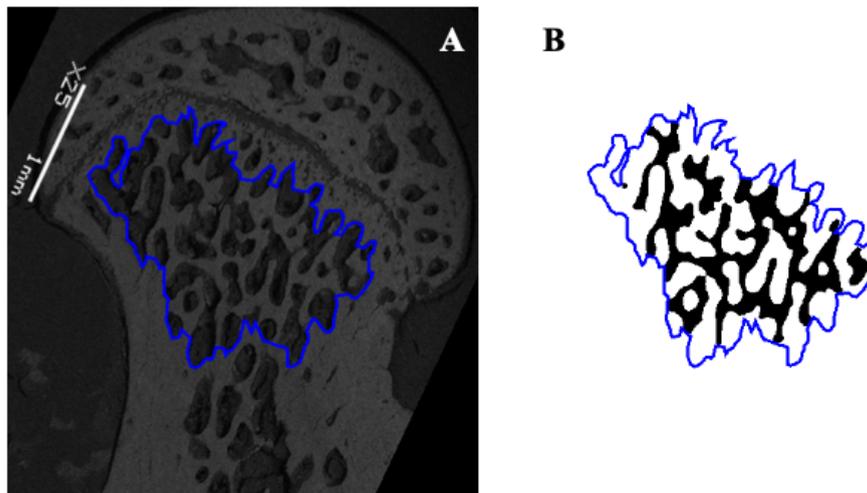


**Figura 3.9:** Muestra de cabeza de fémur preparada para la adquisición de imágenes de microscopía SEM.

En la imagen de microscopía se definió la ROI sobre la región de hueso trabecular (Figura 3.10 A) del hueso y posteriormente la ROI se binarizó (Figura 3.10 B).

En la imagen binarizada se implementó el análisis morfométrico. Dado que las imágenes son 2D, calcular el parámetro  $\text{BV/TV}$  no era posible, por lo tanto, se calculó su análogo bidimensional, la fracción de área de hueso ( $\text{BA/TA}$ ). Adicionalmente se calculó  $\text{Tb.Th}$  y  $\text{Tb.Sp}$  con dos métodos. El primero es una extensión del estándar actual, que es ajustar esferas al hueso trabecular y a los espacios, por lo que se ajustaron círculos a las mismas estructuras y los valores promedios son los parámetros reportados. Para el segundo método

se realizó la medición de área (BA) y perímetro (B.Pm) del hueso para el cálculo de los parámetros a partir del modelo estereológico que asume que las trabéculas tienen geometría cilíndrica. El cálculo se realizó con las ecuaciones (2.1), (2.2) y (2.3).



**Figura 3.10:** Segmentación de la imagen sobre la región de hueso trabecular y la misma región después de la binarización.

Es importante notar que todos los estudios mencionados anteriormente, en los que se analizan cambios en la microarquitectura ósea se realizaron con imágenes microCT de alta resolución (tamaño de voxel 9-18 micras). Pese a que para este trabajo se obtuvieron imágenes microCT, el equipo permite obtener imágenes con un tamaño de voxel de 125 micras, lo cual no permitió hacer un análisis morfométrico en 3D, por lo que se optó por las imágenes de microscopía SEM.

### 3.5.2. Histología

El fémur izquierdo de las ratas se descalcificó en ácido fórmico durante dos semanas para su procesamiento histológico. Se realizaron cortes seriados de 5 micras de grosor y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E).

La tinción con H&E es la más común para análisis histológico. La eosina es un colorante con carga negativa por lo que tiñe, de color rosa, estructuras básicas. La mayoría de las proteínas contenidas en el citoplasma son básicas, por lo que se tiñen de rosa. En contraste, la hematoxilina se une a estructuras cargadas negativamente, dando una tinción azul

o morada. El ADN y el ARN son ácidos, por lo que el núcleo y los ribosomas se tiñen de morado [50].

Posteriormente los cortes se observaron en un microscopio óptico para evaluar el daño causado por la radiación. Esta evaluación sólo se realizó para las ratas del Experimento B.

### 3.6. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPad Prism 8 (San Diego, California, USA), considerando valores promedio y desviación estándar. Las comparaciones intragrupalas se realizaron usando una ANOVA de una sola vía seguido de una prueba post hoc Bonferroni. El nivel de significancia estadística fue fijado en  $p < 0.05$ .

El análisis de varianzas (ANOVA, por sus siglas en inglés) es el procedimiento estadístico inferencial más comúnmente utilizado en el análisis de experimentos [51]. El análisis de varianza de una sola vía se realiza cuando sólo se está evaluando una variable independiente en el experimento (es este trabajo dicha variable es la dosis total prescrita). Es un procedimiento paramétrico que se utiliza para probar la hipótesis de que las medias entre dos o más grupos son iguales, suponiendo que las poblaciones muestreadas siguen una distribución normal [51, 52]. El rechazo de la hipótesis nula indica que existe diferencia significativa entre dos o más grupos; sin embargo, no indica específicamente entre cuales grupos. Por lo tanto, cuando se presentan diferencias significativas un segundo procedimiento estadístico debe realizarse, conocido como comparación *post hoc* [51, 52].

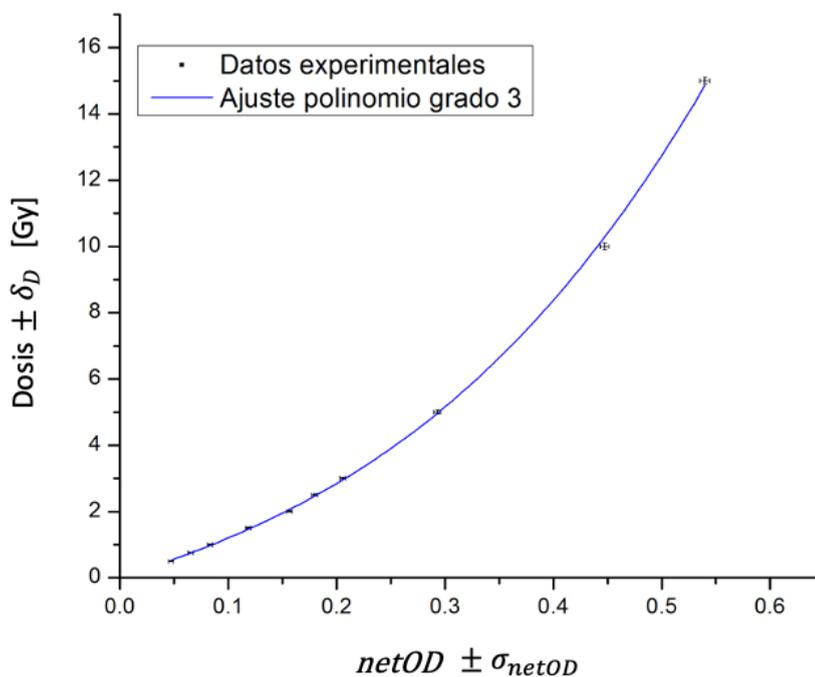
Las pruebas *post hoc* son del tipo de las pruebas t en las que se comparan por pares todos los grupos, para indicar en cuales se presentan las diferencias significativas [51]. Tres de las pruebas *post hoc* más usadas son: Tukey, Scheffé y Bonferroni. Ningún método de comparación es completamente mejor que los otros, cada uno tiene sus aplicaciones [52]. La prueba de Bonferroni usa umbrales basados en la distribución t [53] y tiene la ventaja de que puede comprar muestras de diferentes tamaños [52, 53]. En comparación con otras pruebas *post hoc*, el método Bonferroni es más riguroso que la prueba de Tukey, que tolera los errores tipo I, pero menos riguroso que el muy conservador método de Scheffé [53].

# Capítulo 4

## Resultados

### 4.1. Verificación de la Distribución de Dosis

En la Figura 4.1 se presenta la gráfica la curva patrón Dosis vs. Densidad Óptica neta. Esta curva nos permite determinar, a partir de la netOD (relacionada con el oscurecimiento de la película) la dosis en agua a la que fue irradiada.



**Figura 4.1:** Dosis en función de la densidad óptica para la curva patrón de la película radiocrómica.

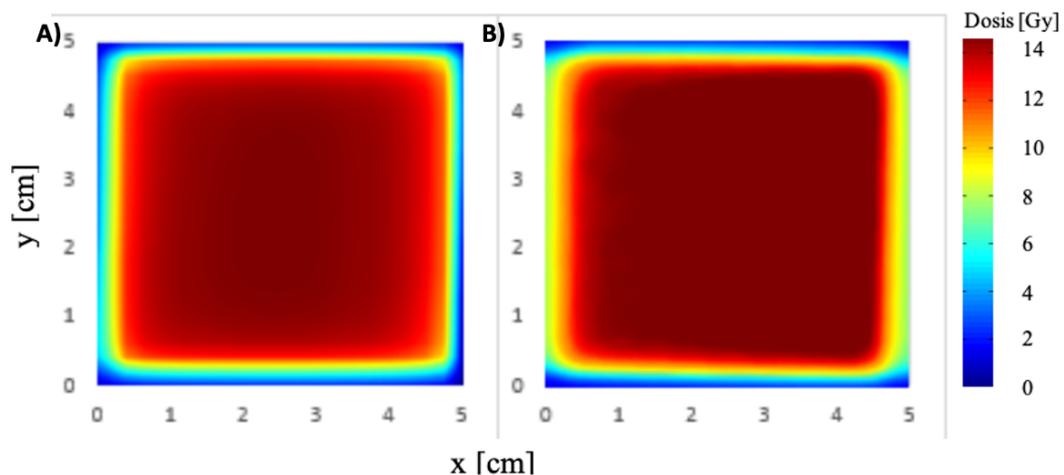
Los puntos obtenidos se ajustaron a la siguiente ecuación, con un coeficiente de determinación de 0.9994:

$$D = A \cdot netOD^3 + B \cdot netOD^2 + C \cdot netOD$$

**Tabla 4.1:** Parámetros del ajuste asociado a la curva patrón de dosis en función de la *netOD*

| Parámetro | Valor | Desviación estándar |
|-----------|-------|---------------------|
| <b>A</b>  | 39.4  | 2.6                 |
| <b>B</b>  | 10.0  | 1.5                 |
| <b>C</b>  | 10.6  | 0.2                 |

Para la verificación de la distribución de dosis se comparó la distribución calculada por el sistema de planeación (Eclipse<sup>TM</sup>), en el plano donde se colocó la película y la distribución medida con película radiocrómica, utilizando el programa DoseLab<sup>®</sup> (versión 4.11).

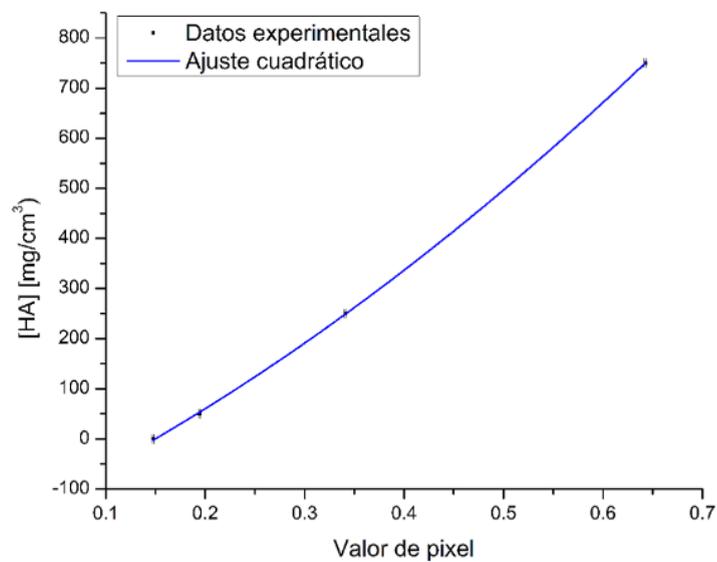


**Figura 4.2:** Distribuciones de dosis para el plan de verificación: A) sistema de planeación y B) medición con película

Se obtuvo una tasa de aceptación de  $\gamma$  del 100 % para los puntos evaluados dentro de los márgenes del campo de irradiación establecido ( $4.5 \times 4.5 \text{ cm}^2$ ). El resultado de la prueba se considera aceptable si al menos el 95 % de los puntos evaluados cumplen con los criterios establecidos. Por lo tanto existe concordancia entre la medición experimental y el sistema de planeación.

## 4.2. Estudios microCT *in vivo*

La Figura 4.3 muestra la curva patrón de [HA] en función del valor de píxel. Esta curva nos permite estimar la concentración de hidroxiapatita en un hueso, a partir del valor de píxel promedio de una imagen microCT.



**Figura 4.3:** Concentración de hidroxiapatita en función del valor de píxel y ajuste de la curva patrón.

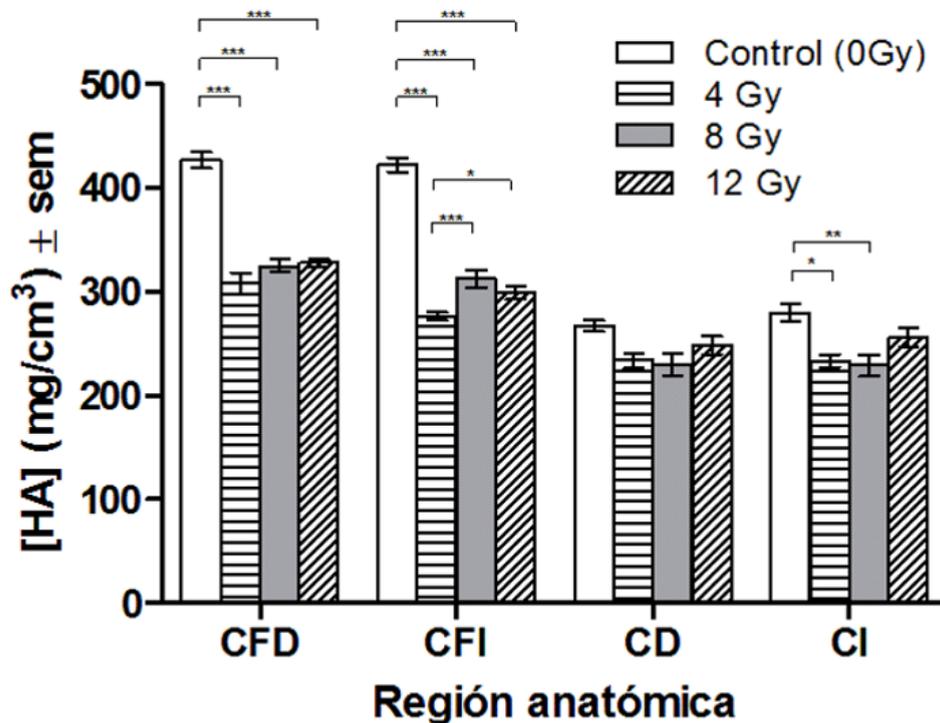
Los resultados de valor de píxel (VP) se ajustaron a la siguiente ecuación, con un coeficiente de determinación de 0.9998:

$$[HA] = A \cdot VP^2 + B \cdot VP + C$$

**Tabla 4.2:** Parámetros del ajuste asociado a la curva patrón de concentración de hidroxiapatita en función de valor de píxel.

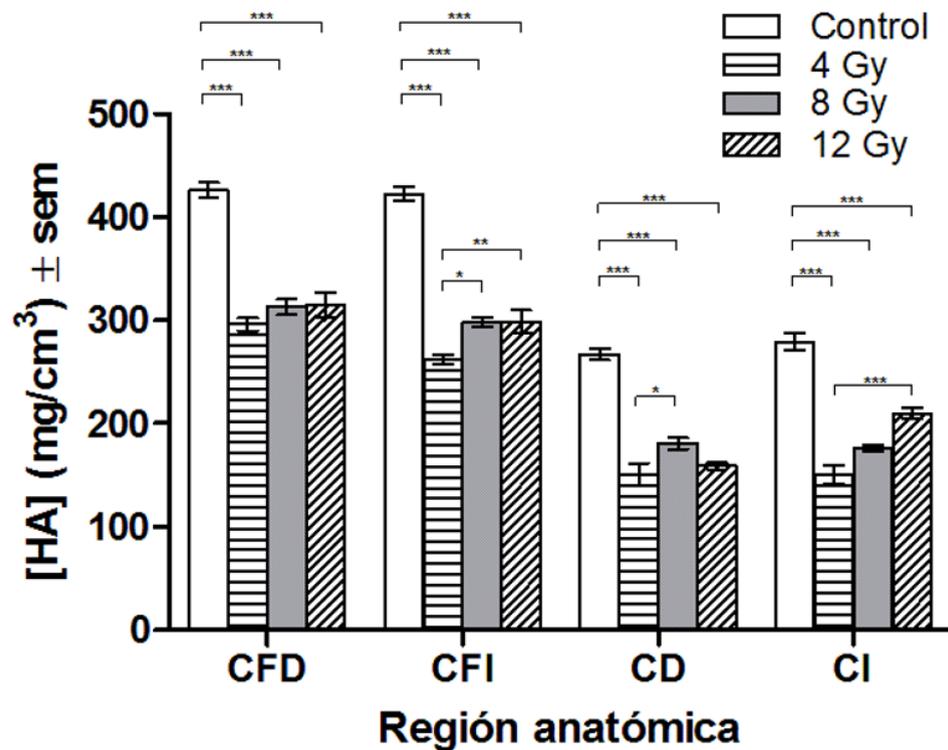
| Parámetro | Valor  | Desviación estándar |
|-----------|--------|---------------------|
| <b>A</b>  | 732.5  | 89.5                |
| <b>B</b>  | 941.2  | 73.0                |
| <b>C</b>  | -157.3 | 11.5                |

Las Figuras 4.4 y 4.5 muestran las concentraciones de hidroxiapatita, en el cuello del fémur y la sección de cadera, obtenidas 61 y 110 días posteriores a la irradiación del Experimento A.



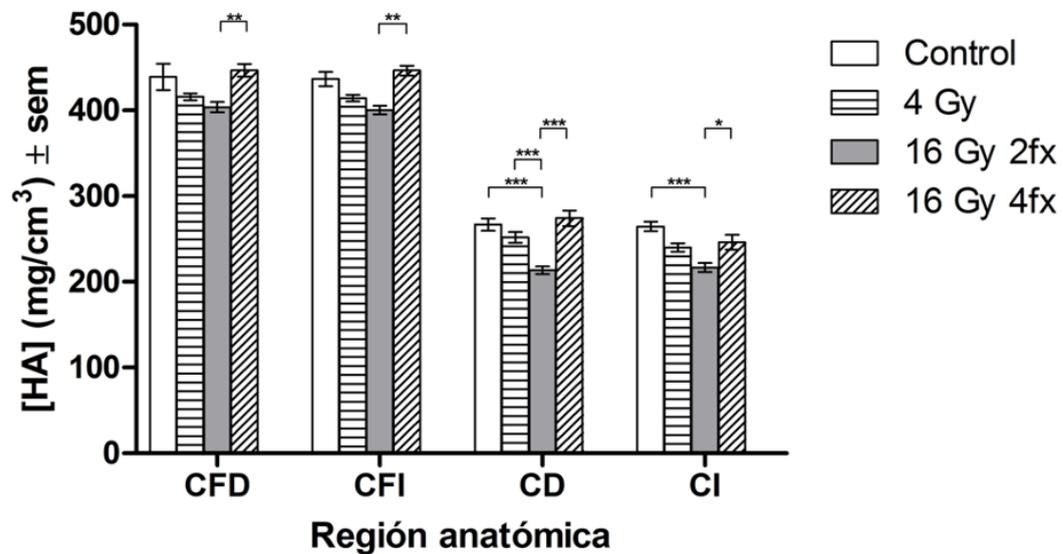
**Figura 4.4:** Valores de [HA] obtenidos para cada región analizada en las ratas del Experimento A, 61 días posteriores a la irradiación. Cuello de fémur derecho (CFD), cuello de fémur izquierdo (CFI), cadera derecha (CD) y cadera izquierda (CI). La notación “\*”, “\*\*” y “\*\*\*” indica  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente.

Los resultados mostraron que en ambos cuellos de fémur se observa una disminución de [HA] de aproximadamente el 25% respecto al control a los dos meses posirradiación ( $p < 0.001$ ). En el caso de la cadera no se observó una reducción de concentración de hidroxiapatita en la primera evaluación, fue hasta el estudio 110 días posirradiación que se mostraron diferencias significativas, aproximadamente 30% menor al control en los grupos experimentales ( $p < 0.001$ ). Para la evaluación a 110 días se mantuvo la disminución de [HA] en CFD y CFI. De hecho, los datos en la región del fémur no presentaron diferencia significativa entre la evaluación a 61 días y la realizada 110 días postirradiación.

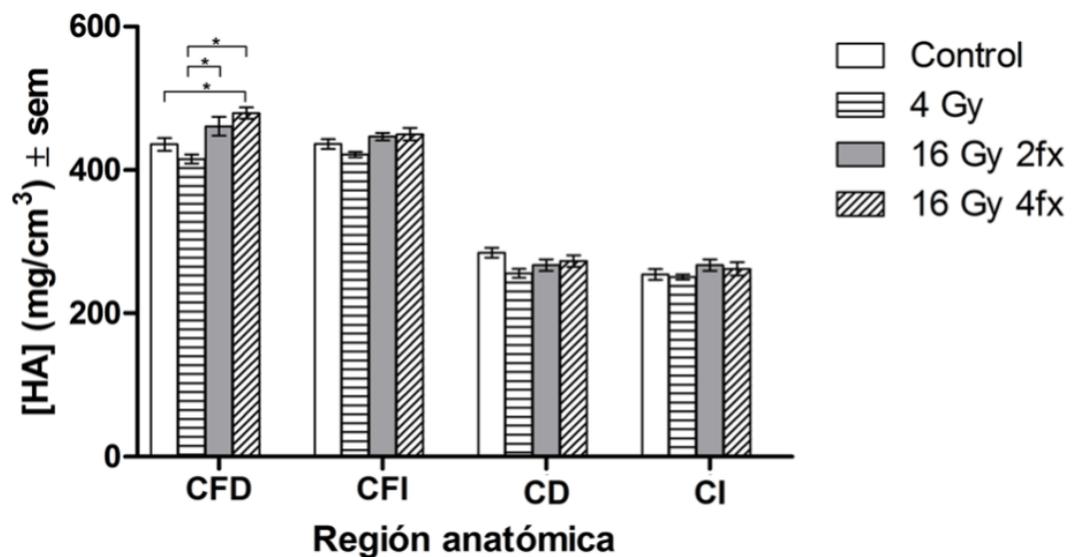


**Figura 4.5:** Valores de [HA] obtenidos para cada región analizada en las ratas del Experimento A, 110 días después de la irradiación. Cuello de fémur derecho (CFD), cuello de fémur izquierdo (CFI), cadera derecha (CD) y cadera izquierda (CI). La notación “\*”, “\*\*” y “\*\*\*” indica  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente.

En estudios previos reportados por diferentes autores en los que se evalúa el daño a hueso producido por radiación en ratas, se han observado cambios en concentración de hidroxiapatita en etapas tempranas, 2 a 3 semanas posterior a la irradiación [11, 32, 54]. Lo anterior motivó la evaluación de la [HA] en etapas tempranas postirradiación: 22 y 50 días. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 4.6 y 4.7 para los 22 y 50 días posirradiación, respectivamente.



**Figura 4.6:** Valores de [HA] obtenidos para cada región analizada de los sujetos del Experimento B, 22 días posteriores a la irradiación. Cuello de fémur derecho (CFD), cuello de fémur izquierdo (CFI), cadera derecha (CD) y cadera izquierda (CI). La notación “\*”, “\*\*” y “\*\*\*” indica  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente.



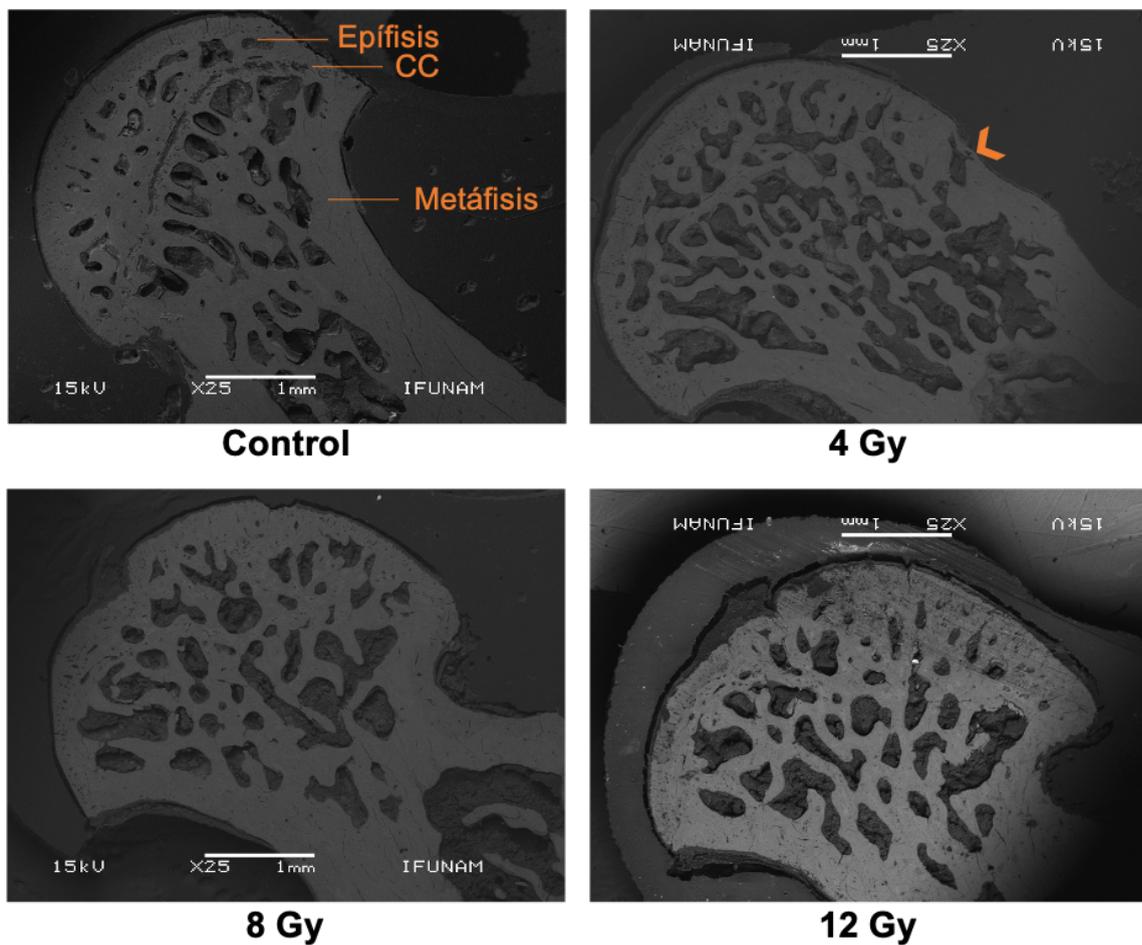
**Figura 4.7:** Valores de [HA] obtenidos para cada región analizada de los sujetos del Experimento B, 50 días posteriores a la irradiación. Cuello de fémur derecho (CFD), cuello de fémur izquierdo (CFI), cadera derecha (CD) y cadera izquierda (CI). La notación “\*”, “\*\*” y “\*\*\*” indica  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente.

Para la evaluación a 22 días no se obtuvieron diferencias marcadas de los grupos experimentales con el grupo control. En el caso del CFI, se observan algunas diferencias entre grupos experimentales, sin embargo no se encontraron diferencias significativas respecto al control. En la evaluación realizada a los 50 días, tampoco se observa una diferencia significativa entre los grupos irradiados y el control. Lo anterior se puede asociar a que las ratas del grupo B son jóvenes (aproximadamente 12 semanas).

### 4.3. Imágenes de Microscopía SEM

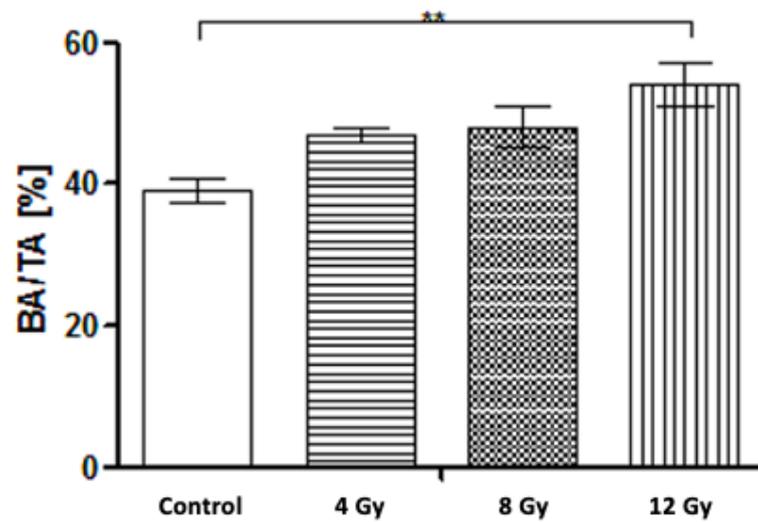
En la Figura 4.8 se muestran imágenes representativas del Experimento A obtenidas con las microscopías SEM. A partir de estas imágenes se realizó el cálculo de parámetros de microarquitectura trabecular.

Cualitativamente, en el grupo control se observan espacios trabeculares de tamaños relativamente homogéneos, además de que la región de cartílago de crecimiento (CC) se presenta de manera normal; en la epífisis se presentan trabéculas pequeñas, en comparación con las presentadas en la metáfisis. En las muestras del grupo irradiado a 4 Gy se presentan espacios trabeculares más largos que incluso se observan en la periferia del hueso (cabeza de flecha); no se observa cartílago de crecimiento y en la epífisis se muestran espacios trabeculares de grosor similar a los de la metáfisis. En la imagen del grupo de 8 Gy se observan espacios trabeculares más gruesos comparados con el control, no presentan región de cartílago de crecimiento y las trabéculas presentan mayor grosor en comparación con las del grupo Control y son similares en epífisis y metáfisis. El hueso de las ratas irradiadas a 12 Gy presenta trabéculas alargadas y gruesas y tampoco muestra presencia de la región del cartílago de crecimiento.

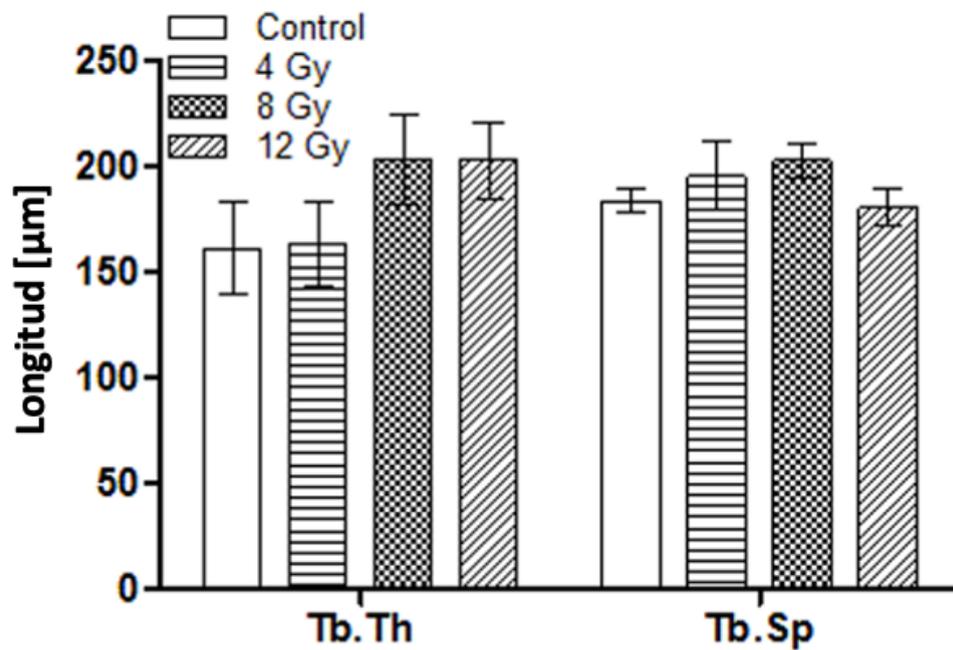


**Figura 4.8:** Imágenes representativas de microscopía SEM del de la cabeza de fémur de los sujetos del Experimento A para grupo Control y 4, 8 y 12 Gy. La cabeza de flecha señala la presencia de espacio trabecular en la periferia del hueso.

Al analizar las imágenes se obtuvieron los parámetros morfométricos, definidos en las páginas 14 y 15. Lo obtenido para el parámetro BA/TA se muestra en la Figura 4.9. Posteriormente se obtuvieron los parámetros Tb.Th y Tb.Sp con el plugin BoneJ; dichos resultados se presentan en la Figura 4.10. Estos mismos parámetros, además de Tb.N, se obtuvieron a partir del modelo estereológico (ecuaciones (2.1) a (2.3)), estos resultados se presentan en las Figuras 4.11 y 4.12



**Figura 4.9:** Fracción de área de hueso obtenida para cada grupo de los sujetos del Experimento A. La notación “\*\*\*” indica  $p < 0.01$



**Figura 4.10:** Tb.Th y Tb.Sp obtenido con BoneJ para cada esquema de fraccionamiento de los sujetos del Experimento A. En ningún caso se presentan diferencias estadísticamente significativas.

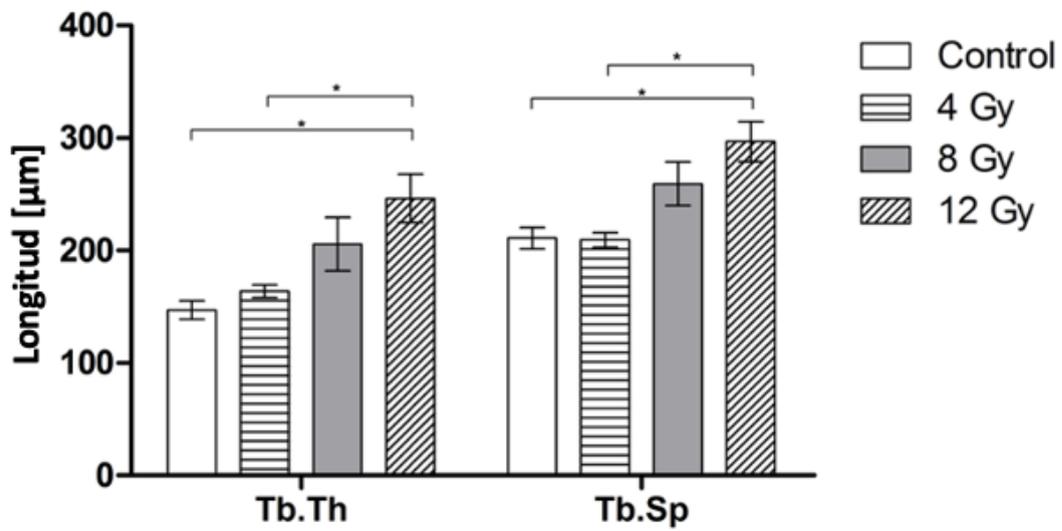


Figura 4.11: Tb.Th y Tb.Sp obtenidos del modelo estereológico para cada esquema de fraccionamiento de los sujetos del Experimento A. La notación “\*” indica  $p < 0.05$

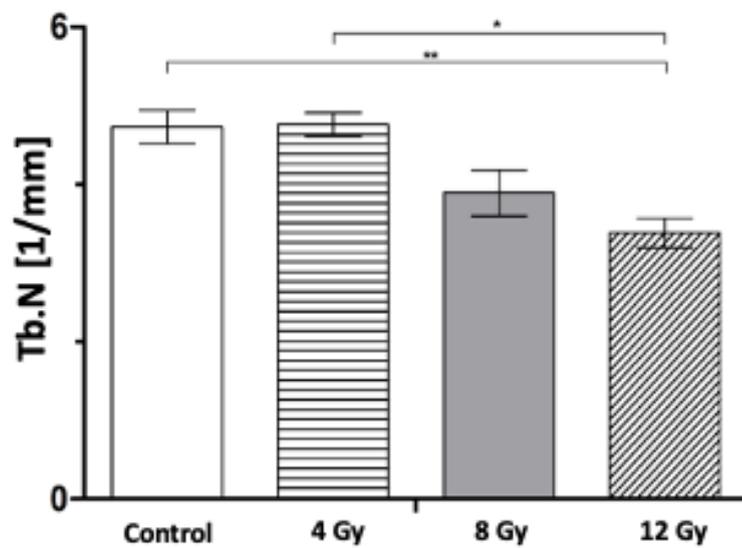
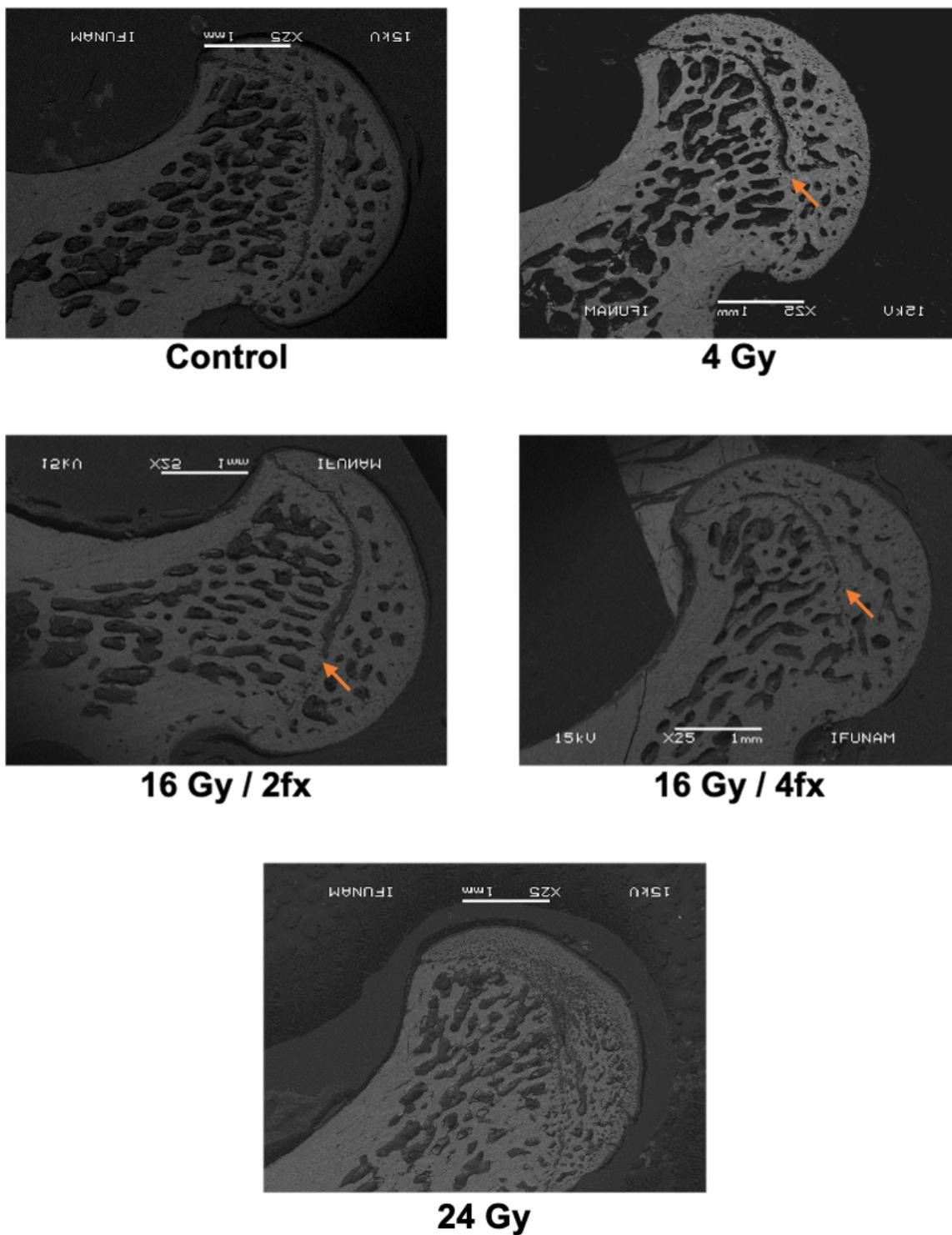


Figura 4.12: Tb.N obtenido del modelo estereológico para cada esquema de fraccionamiento de los sujetos del Experimento A. La notación “\*” y “\*\*” indica  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente.

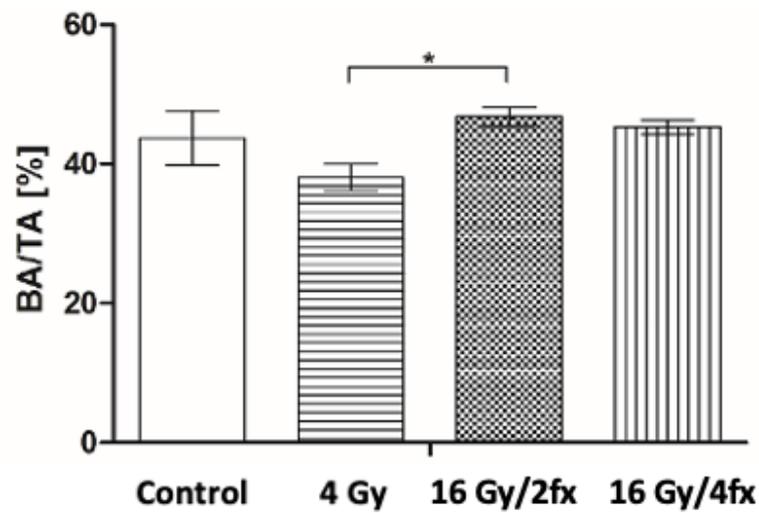
En BA/TA se observa una tendencia creciente con la dosis, sin embargo sólo existe diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) con el grupo prescrito a 12 Gy. Respecto a lo obtenido con BoneJ, pese a que cualitativamente se observan cambios en la estructura ósea, el análisis de las imágenes no detectó cambios entre el grupo control y el experimental ni entre los grupos irradiados a distintas dosis. Por otro lado, el análisis a partir del modelo estereológico mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo prescrito a 12 Gy y los grupos control y 4Gy. Dichas diferencias se mantienen en los tres parámetros evaluados. Adicionalmente, en Tb.Th y Tb.Sp se observa una tendencia creciente con la dosis y en Tb.N decreciente.

En la Figura 4.13 se muestran imágenes representativas de las microscopías SEM del Experimento B. Cualitativamente, el grupo control presenta la región del cartílago de crecimiento (CC) de manera normal, los espacios trabeculares son relativamente homogéneos y presentes de manera normal tanto en epífisis como metáfisis. Se observa pérdida parcial de la zona de cartílago de crecimiento en los grupos irradiados, la flecha señala la sección en la que comienza a perderse el CC. En el grupo de 4 Gy no se observan cambios considerables respecto al control. En los grupos de 16 Gy, tanto en dos y cuatro fracciones, se presentan espacios trabeculares más alargados y una menor presencia de espacios en la epífisis. En el grupo de 24 Gy se observa una zona altamente porosa en la epífisis, además la metáfisis presenta espacios trabeculares heterogéneos y de forma poco regular; es importante mencionar que este grupo de animales se sacrificó 4 días después de finalizar las irradiaciones, debido a complicaciones asociadas a los efectos de radiación.

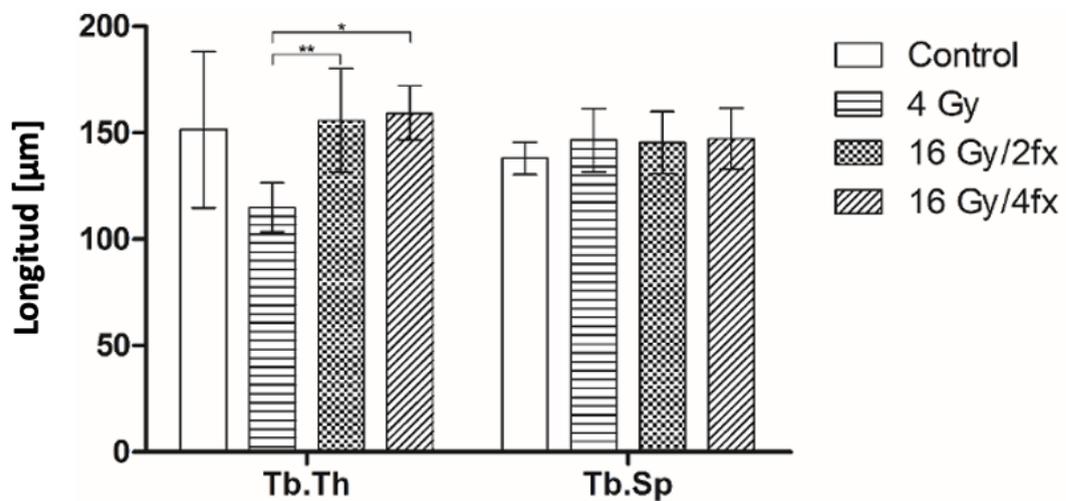
En la Figura 4.14 se muestra la gráfica de la fracción de área de hueso. En la Figura 4.15 se presentan los resultados obtenidos con el análisis de BoneJ y en las Figuras 4.16 y 4.17 lo obtenido con el modelo estereológico.



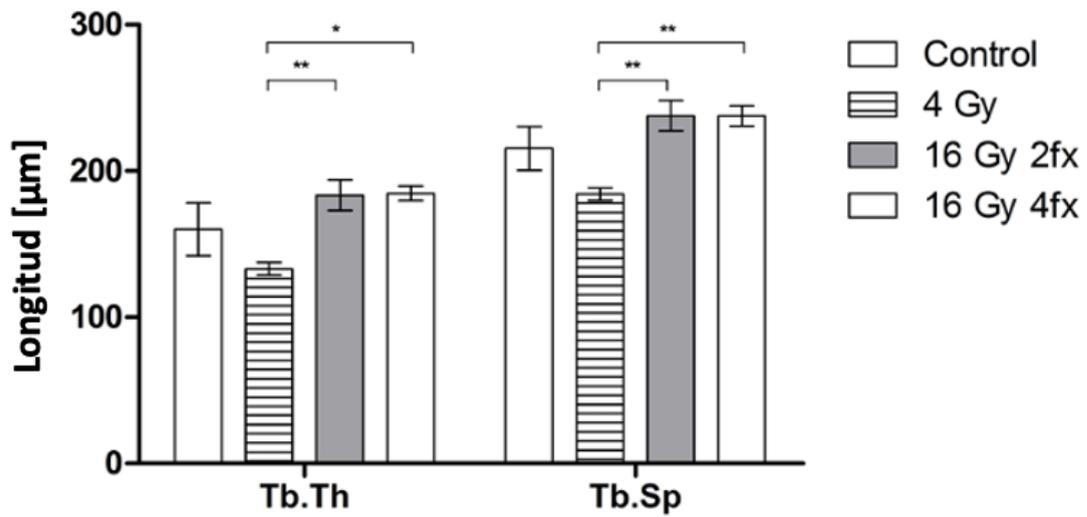
**Figura 4.13:** Imágenes representativas de microscopía SEM de la cabeza de fémur de cada esquema de fraccionamiento del Experimento B. La flecha señala la región en la que deja de haber presencia de CC.



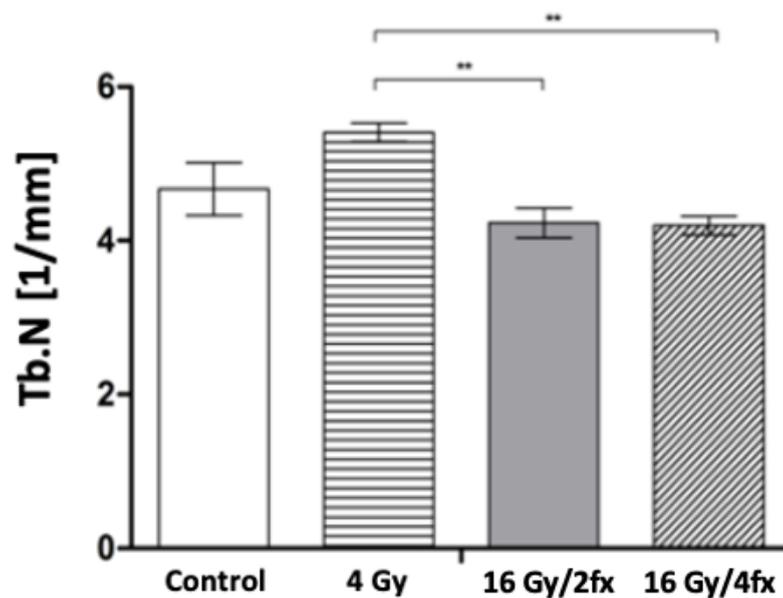
**Figura 4.14:** Fracción de área de hueso (BA/TA) obtenida para los sujetos del Experimento B. La notación “\*” indica  $p < 0.05$



**Figura 4.15:** Tb.Th y Tb.Sp obtenidos con BoneJ para esquema de fraccionamiento de los sujetos del Experimento B. La notación “\*” y “\*\*” indica  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente.



**Figura 4.16:** Tb.Th y Tb.Sp obtenidos del modelo estereológico para cada esquema de fraccionamiento de los sujetos del Experimento B. La notación “\*” y “\*\*” indica  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente.



**Figura 4.17:** Tb.N obtenido del modelo estereológico para cada esquema de fraccionamiento de los sujetos del Experimento B. La notación “\*\*” indica  $p < 0.01$

La fracción de hueso (BA/TA) no mostró cambios respecto al control. El análisis con BoneJ indicó algunas diferencias en Tb.Th entre el grupo prescrito a 4 Gy y los grupos prescritos a 16 Gy, por otro lado en Tb.Sp no se observaron diferencias significativas. Al realizar el análisis de esos mismos parámetros con el modelo estereológico, las diferencias observadas en Tb.Th se conservaron; para Tb.Sp y Tb.N se presentaron diferencias entre los mismos grupos que presentaron diferencias en Tb.Th. Sin embargo no se observó diferencia respecto al grupo control ni una tendencia de los parámetros analizados.

#### 4.4. Estudio Histológico (Experimento B)

En la Figura 4.18, se presenta una serie de imágenes histológicas teñidas con hematoxilina y eosina, las cuales son representativas de cada uno de los grupos y corresponden a la cabeza de fémur. Comparando las imágenes, histológicamente se observan diferencias en los grupos experimentales con respecto al control.

En el grupo control se observa su centro de crecimiento de una manera homogénea de un extremo a otro; en los grupos de 4 Gy y 16 Gy/2 fx se observa ligeramente más ancho en la zona central, en contraste con el grupo de 16 Gy/4fx y 24 Gy, se observa el centro de crecimiento más ancho en la zona central y delgado en los extremos.

En la zona de la epífisis, todos los grupos presentan espacios medulares; sin embargo, los experimentales tienen menor cantidad y forma irregular, cabe señalar que en el grupo de 24 Gy dichos espacios se encontraron vacíos.

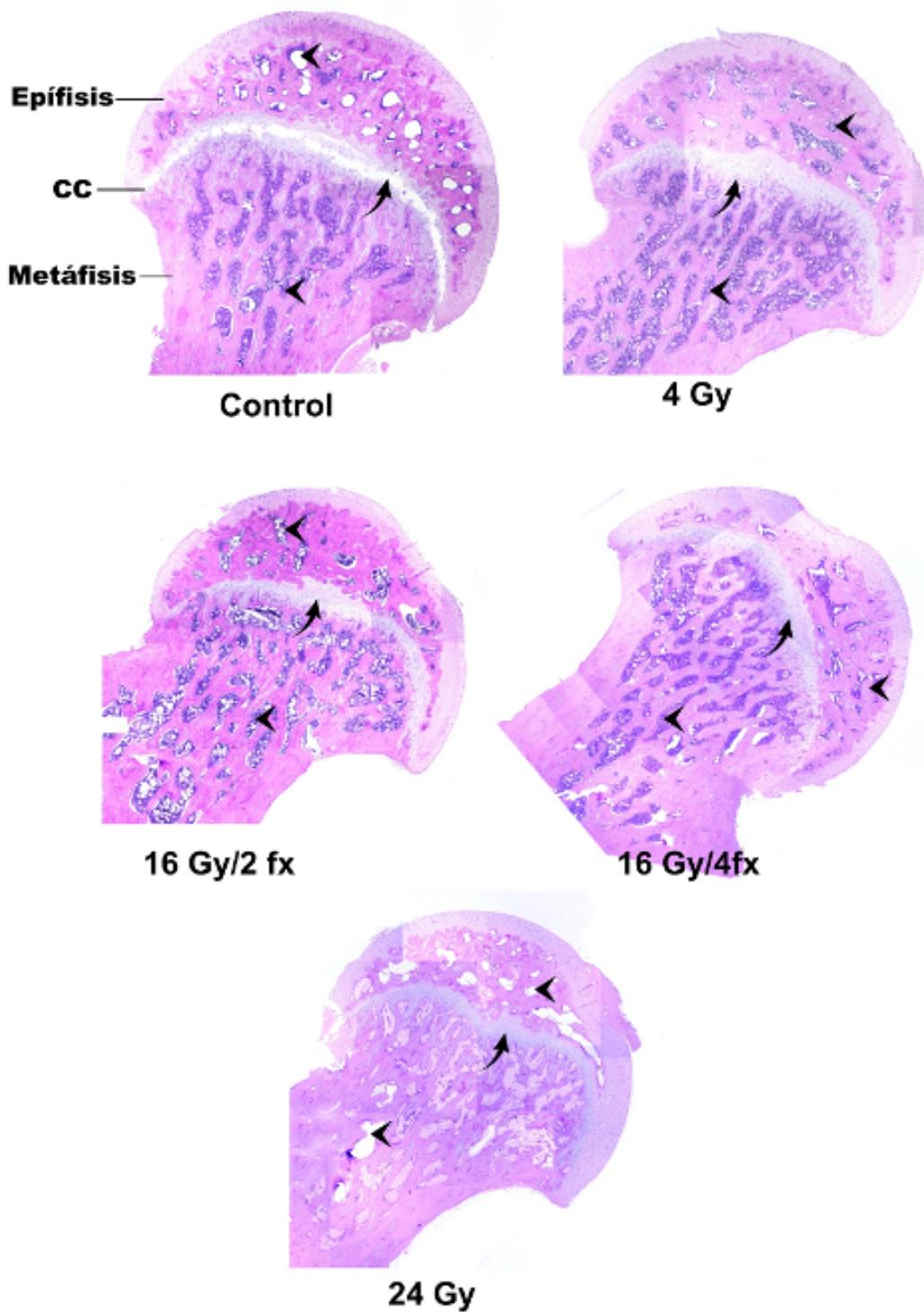
En la parte de la metáfisis, los grupos experimentales presentan mayor cantidad de espacios medulares con respecto al control. A un aumento 10x (Figura 4.19), el grupo control se observa vital y normal, con presencia de medula ósea y osteocitos en la periferia, os-

teocitos en sus lagunas así como la presencia de líneas concéntricas y diferentes grados de mineralización (Figura 4.19 A).

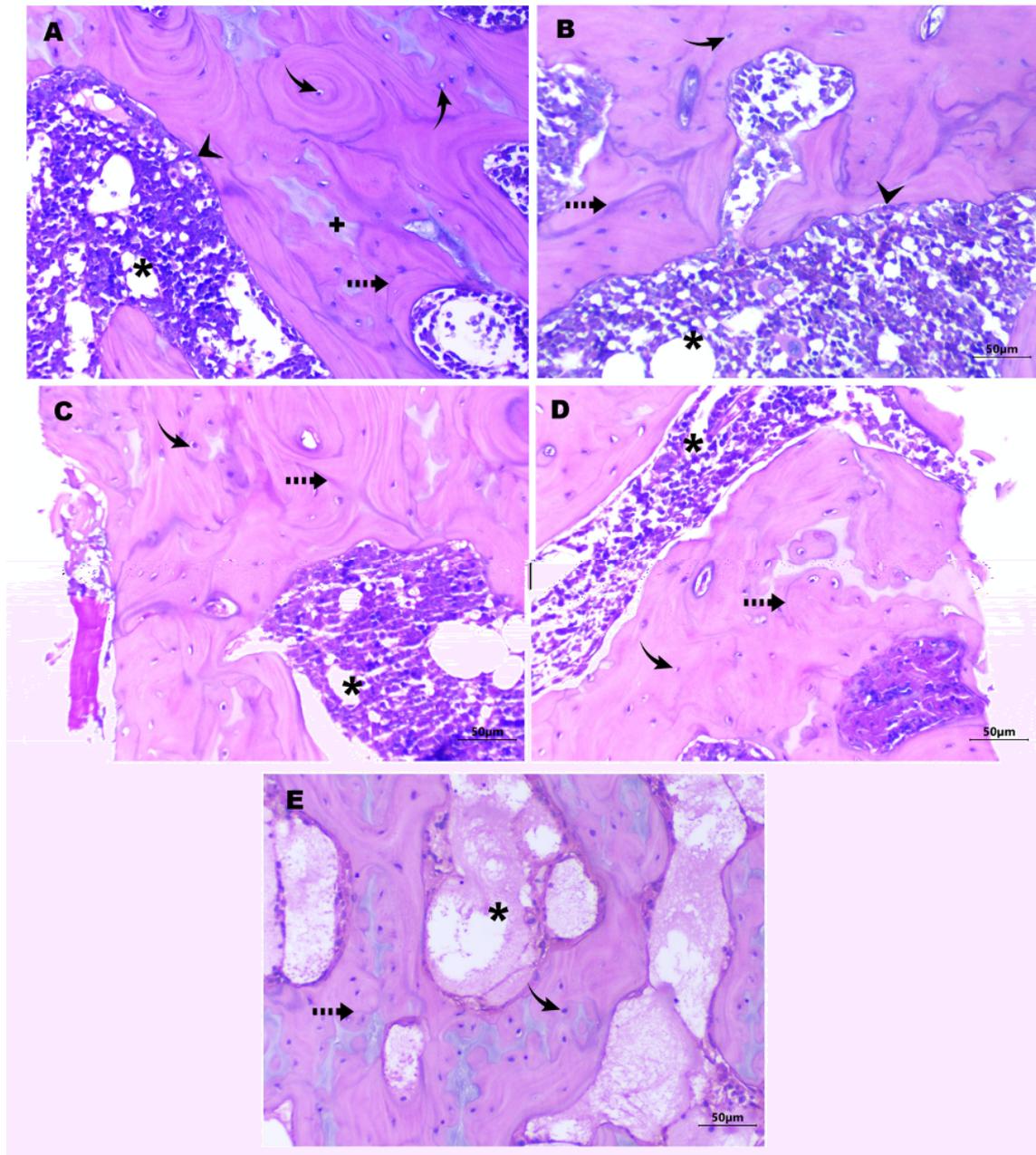
A un aumento 10x en el grupo de 4 Gy (Figura 4.19 B) se observan pequeñas diferencias con respecto al control; la cantidad de tejido medular se ve ligeramente disminuida al igual que la presencia de osteoblastos y osteocitos.

El grupo irradiado a 16 Gy, tanto en dos y cuatro fracciones, presenta trabéculas de tamaño heterogéneo los cuales parecen fusionarse (Figura 4.18); es importante notar que los espacios trabeculares están muy cerca de la periferia. A un aumento 10x (Figura 4.19 C y D), en la zona medular se observa que las células hematopoyéticas se están perdiendo, no hay presencia de osteoblastos y las líneas concéntricas se observan más delgadas y en general el tejido óseo es más eosinófilo (color rosado).

En el grupo irradiado a 24 Gy, se observa formación de múltiples trabéculas de tamaño heterogéneo (Figura 4.18). A mayor aumento se identifica que los espacios medulares no presentan células hematopoyéticas, no se observa la presencia de osteoblastos en la periferia, en el hueso cortical se identifican osteocitos con un núcleo de mayor tamaño y sin citoplasma, las líneas concéntricas se van perdiendo a pesar de presentar el tejido óseo una coloración basófila (morada) un poco más pálida que el control; al tener osteocitos sin citoplasma, el tejido óseo terminaría presentando necrosis (Figura 4.19 E).



**Figura 4.18:** Cortes histológicos representativos de cada grupo, correspondientes al Experimento B. Cc= Centro de crecimiento. La flecha indica el centro de crecimiento y la cabeza de flecha el espacio medular.



**Figura 4.19:** Cortes histológicos teñidos con H&E a 10X representativos de cada grupo. A); Control, B); 4Gy, C); 16 Gy/2 fx, D); 16 Gy/4 f y E) 24 Gy. \* indica a la Medula ósea, la cabeza de flecha señala los osteoblastos, la flecha osteocitos y la flecha punteada las líneas concéntricas, + indica zona de menor calcificación.

# Capítulo 5

## Discusión

Se estima que aproximadamente dos tercios de los pacientes con tumores malignos reciben radioterapia como parte de su tratamiento y pese a que nuevas técnicas mejoran el depósito de dosis de radiación, disminuyendo las regiones de tejido sano que es irradiado, el tejido óseo sigue siendo uno de los más afectados durante un tratamiento de radioterapia en pacientes de cáncer ginecológico y de cáncer de próstata. Se han realizado diversos estudios sobre el efecto de la radiación en el hueso pero hasta la fecha no existe una solución curativa para esta pérdida ósea inducida por la radiación. Esta situación motiva el desarrollo de modelos preclínicos de radioterapia que permitan evaluar posibles tratamientos contra la radio-osteoporosis.

Este trabajo tuvo como objetivo principal la determinación de un esquema de fraccionamiento de irradiación con un Linac de 6 MV en rata *Wistar* adulta para evaluar la inducción de osteoporosis en tejido óseo de la región pélvica. Con este fin se estandarizó un método de irradiación de la región pélvica de ratas y posteriormente se evaluaron los cambios de concentración de hidroxapatita y parámetros morfométricos del hueso trabecular con dos técnicas distintas, además de una evaluación histológica.

Los resultados de la prueba de índice gamma mostraron concordancia entre la distribución de dosis de planeación y de medición, dentro de los márgenes del campo de radiación, por lo que se considera que el método de irradiación utilizado es adecuado. Recientemente, otros investigadores reportaron [25] el efecto en el perfil de dosis, al utilizar un maniquí tejido equivalente con material óseo en su interior, irradiado con fotones de 15 MV y di-

ferentes tamaños de campo. Se mostró que la magnitud del efecto sobre el perfil de dosis en profundidad, debido a la presencia de tejido óseo fue de un 10, 5 y 3% para campos de 1x1, 3x3 y 10x10 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Con la finalidad de descartar variaciones de la dosis planeada y la depositada en nuestro modelo, actualmente se trabaja en un maniquí tejido equivalente con estructura ósea en su interior, que simule la región pélvica de las ratas *Wistar* adultas.

En cuanto a la concentración de hidroxiapatita, en el Experimento A se observó una reducción considerable (Figuras 4.4 y 4.5) respecto al grupo control. Este efecto de la radiación sobre el tejido óseo se puede relacionar directamente con su efecto sobre los osteoblastos. Se sabe que los osteoblastos son los encargados de secretar la matriz orgánica; en esta matriz se depositan los cristales de hidroxiapatita. En estudios previos se mostró que al irradiar cultivos de células osteoblásticas con rayos  $\gamma$  de una fuente de Cs-137 se genera una alteración en la expresión de citocinas que resultan en cambios en la diferenciación osteoblástica. Adicionalmente, la radiación ionizante induce una disminución en la viabilidad celular de osteoblastos causada por la inhibición del ciclo celular debido a un arresto G2M [26, 27]. Por lo anterior, la disminución de la actividad osteoblástica se puede considerar como la principal causa de disminución de [HA] radio-inducida.

Por otro lado, en el Experimento B no se observó una disminución a los 22 y 50 días posteriores a la irradiación; sin embargo, trabajos previos en los que se irradiaron zonas localizadas de ratas hembras reportaron cambios en ese mismo parámetros a 2 y 3 semanas postirradiación. Estudios *in vitro* [32] sugieren que en ratas adultas ( $\approx$  4 meses, pesos  $\approx$  350 g) se observa una disminución de la formación ósea debido a una menor población de células del estroma y una menor capacidad de la diferenciación de estas células. Adicionalmente, evaluaciones histológicas [33] mostraron que la regeneración ósea en grupos control estuvo hasta 7 días por delante en ratas jóvenes, lo que indica de una disminución de la capacidad regenerativa asociada a la edad de las ratas per se. Además la formación de hueso nuevo en el grupo de ratas viejas irradiadas se presentó con un retraso muy marcado respecto a las ratas jóvenes y al control, lo cual sugiere una mayor vulnerabilidad de las ratas viejas a la radiación. Por lo tanto la ausencia de respuesta observada para las ratas del Experimento B se podría asociar a que éstas eran relativamente jóvenes (aproximadamente 12 semanas).

Cabe mencionar, que pese a que los Experimentos A y B no son comparables (machos vs. hembras), los sujetos del Experimento A tenían el doble de edad, lo que posiblemente favoreció la inducción del daño.

Respecto a la morfometría de hueso trabecular, en el Experimento A se observan diferencias cualitativas en las imágenes SEM y pese a que el análisis con BoneJ no refleja dichos cambios, estereológicamente se perciben diferencias para todos los parámetros evaluados (ver Figuras 4.13-4.17), entre el control y el grupo prescrito a una dosis total de 12 Gy. A pesar de que no se observaron diferencias significativas, tanto del control con los otros grupos irradiados como entre los grupos irradiados con diferentes fraccionamientos, se observa una tendencia en los datos.

Los resultados obtenidos para el Experimento A concuerdan con diversos estudios que se han realizado con ratas de distintas cepa, sexo y con un modelo de inducción de osteoporosis distinto. En 2008 [23] se reportó un modelo de inducción de osteoporosis, en el que se utilizaron ratas hembra Sprague Dawley de 20 semanas, irradiadas con un Linac de 6 MV a 16 Gy en cuatro fracciones. La evaluación microCT *ex vivo*, realizada a las 2 y 4 semanas posirradiación, mostró diferencias significativas entre su grupo control y el irradiado. Se presentó un aumento en el Tb.Th para la semana 2 ( $p < 0.1$ ), así como un aumento en el Tb.Sp y disminución del Tb.N en las semanas 2 y 4 (en ambos casos,  $p < 0.01$  a las 2 semanas y  $p < 0.05$  a las 4 semanas). Por otro lado, en 2013 [11] se evaluó la hormona tiroidea PTH para la prevención de osteoporosis inducida por radiación. Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley con edad de un mes, las cuales fueron irradiadas con un microCT a 2.88 Gy en 6 fracciones (una fracción cada 2 días). Se realizó un microCT *ex vivo* de la tibia el día 12, día en que recibieron la última fracción. Se observó una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) de las ratas irradiadas respecto al control en los parámetros BV/TV y Tb.N, mientras que un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) del Tb.Sp. Tb.Th no mostró diferencias significativas respecto al control. Por último, en 2016 [32] se publicó un trabajo que incluye la evaluación de cambios morfológicos del hueso trabecular, en ratas hembra *Wistar* de 20 semanas sometidas a extracción de ovarios a la edad de 8 semanas. Se realizó evaluación con imágenes microCT *ex vivo*. Los parámetros BV/TV y Tb.N tuvieron una disminución, respecto al grupo no ovariectomizado, con  $p < 0.004$  y  $p < 0.01$ ; el parámetro Tb.Sp aumentó ( $p < 0.016$ ) y Tb.Th no presentó diferencias.

Es importante notar que los estudios mencionados se realizaron con imágenes microCT de alta resolución (tamaño de voxel 9-18 micras). Pese a que para este trabajo se obtuvieron imágenes microCT, el equipo con el que se realizaron cuenta con un tamaño de voxel de 125 micras, lo cual no permitió hacer un análisis morfométrico en 3D. Sin embargo, el análisis estereológico, a partir de las imágenes SEM concuerda con las tendencias esperadas en los parámetros Tb.Sp y Tb.N. Por otro lado, en el análogo bidimensional de BV/TV (BA/TA) que se obtuvo en este trabajo, las tendencias son contrarias a lo observado en los trabajos citados, lo cual se podría explicar debido a un posible fusiónamiento de las trabéculas, como resultado de un mecanismo de respuesta a la radiación, lo cual también explicaría la tendencia creciente de Tb.Th. Sin embargo, el hecho de que haya una mayor fracción de hueso, no implica que sea hueso sano; de hecho, se mostró en la sección anterior que existe una disminución de aproximadamente 25 % de la concentración de HA en la misma región del hueso irradiado respecto al control.

Los resultados obtenidos con el método estereológico indican que se podrían medir los parámetros morfométricos y lograr detectar diferencias entre fraccionamientos.

Por otra parte, en el Experimento B, cualitativamente se observan cambios de los grupos irradiados (16 Gy y 24 Gy) respecto al control. En términos del análisis morfométrico realizado con BoneJ sólo se presentó diferencia, entre grupos irradiados, en el parámetro Tb.Th. Con el análisis estereológico se obtuvo la misma diferencia en Tb.Th y adicionalmente se presentaron diferencias entre los mismos grupos irradiados, para Tb.Sp y Tb.N; sin embargo los datos no presentaron diferencias respecto al grupo control ni una tendencia clara. Esto plantea la necesidad de evaluar nuevas técnicas de análisis de imágenes que sean más sensibles a estos cambios observados en las imágenes SEM.

Como ya se ha descrito anteriormente [11], en las imágenes histológicas se observó disminución de osteoblastos en la zona de la médula (Experimentales vs. Control), lo cual puede asociarse con una falta de remodelación ósea. Adicionalmente, en los grupos irradiados a 16 Gy y 24 Gy se evidenció una pérdida de células hematopoyéticas, lo cual se ha reportado anteriormente como efecto tardío de la radiación en hueso [17]. En las ratas irradiadas a 24 Gy no se evidenció la presencia de médula ósea ni de osteocitos, siendo animales que

fueron sacrificados 4 días después de la irradiación debido a los efectos secundarios que se presentaron.

Con base en las imágenes histológicas, se observó un efecto de la radiación a nivel microestructural y celular, sin embargo para poder cuantificar estos cambios se debería implementar un estudio de inmunohistoquímica para elementos celulares específicos, como osteoclastos, osteoblastos y monocitos, con el fin de determinar el grado de mineralización.

# Capítulo 6

## Conclusión

Los esquemas de irradiación implementados en este trabajo permitieron evaluar daño al tejido óseo, en términos de la disminución de concentración de HA en el hueso y alteración en los parámetros morfométricos BA/TA, Tb.Th, Tb.Sp y Tb.N cuantificados por un método esterológico a partir de las imágenes SEM. La irradiación de ratas hembra jóvenes no mostraron cambios contundentes en [HA]; no obstante, la inspección visual de las imágenes SEM e histológicas, indicó que existen cambios morfométricos que podemos asociar a la radiación. Por lo tanto los esquemas propuestos en este trabajo podrían funcionar para desarrollar un modelo de inducción de osteoporosis por radiación. Sin embargo, las limitantes en resolución del microCT utilizado hacen necesario mejorar las técnicas de análisis para cuantificar cambios en la microarquitectura ósea.

### **Perspectivas**

Incrementar el tamaño muestral de los grupos en los que se observó claramente el efecto de radiación para corroborar la tendencia de los datos. Se evaluarán de nuevas técnicas de análisis de imagen (i.e. análisis frecuencias o de texturas), que mejoren el cálculo de parámetros morfométricos.

Cuantificar de manera adecuada y con la sensibilidad necesaria para observar los cambios entre fraccionamientos, permitirá el cálculo del cociente  $\alpha/\beta$  para hueso de rata *Wistar* adulta, ya que asumir que éste tiene el mismo valor que el del humano no es del todo adecuado para el desarrollo de un modelo de radio-osteoporosis.

# Bibliografía

- [1] Hirose, B. Y. H. (2013). *Ciencias de la salud*. Ciudad de México. McGraw-Hill Interamericana, 62-64.
- [2] Martini, F. H., Nath, J. L., & Bartholomew, E. F. (2015). *Fundamentals of Anatomy and Physiology*. New Jersey. Pearson Prentice Hall, 178-192.
- [3] International Osteoporosis Foundation. (2017). Introduction to bone biology: all about our bones. Recuperado de: <https://www.iofbonehealth.org/introduction-bone-biology-all-about-our-bones>. [Último acceso: Junio 2018].
- [4] Pró, E. A. (2012). *Anatomía clínica*. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana, 21-29.
- [5] Reynolds, R. J., & Schecker, J. A. (1995). Radiation, cell cycle, and cancer. *Los Alamos Science*, 23, 51-89.
- [6] World Health Organization (2006). *Cancer control: knowledge into action - WHO guide for effective programmes: diagnosis and treatment*. Geneva. WHO Press.
- [7] Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2014). Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in molecular biosciences*, 1, 24. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00024>
- [8] National Cancer Institute. *Radiation Therapy to Treat Cancer*. U.S. Department of Health and Human Services. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy>. [Último acceso: Julio 2018].
- [9] Corre, I., Niaudet, C., & Paris, F. (2010). Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutation research*, 704(1-3), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.01.014>

- [10] Steele, C. B., Li, J., Huang, B., & Weir, H. K. (2017). Prostate cancer survival in the United States by race and stage (2001-2009): Findings from the CONCORD-2 study. *Cancer*, 123 Suppl 24(Suppl 24), 5160–5177. <https://doi.org/10.1002/cncr.31026>
- [11] Chandra, A., Lan, S., Zhu, J., Lin, T., Zhang, X., Siclari, V. A., Altman, A. R., Cengel, K. A., Liu, X. S., & Qin, L. (2013). PTH prevents the adverse effects of focal radiation on bone architecture in young rats. *Bone*, 55(2), 449-457. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.02.023>
- [12] Moussazadeh, N., Laufer, I., Werner, T., Krol, G., Boland, P., Bilsky, M. H., & Lis, E. (2015). Sacroplasty for cancer-associated insufficiency fractures. *Neurosurgery*, 76(4), 446–450. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000000658>
- [13] Fajardo, L. F., Berthrong, M., & Anderson, R. E. (2001). Musculoskeletal system. In *Radiation pathology* (pp. 365-377). New York. Oxford University Press, 365-377.
- [14] Pitkänen, M. A., & Hopewell, J. W. (1983). Functional changes in the vascularity of the irradiated rat femur. Implications for late effects. *Acta radiologica. Oncology*, 22(3), 253–256. <https://doi.org/10.3109/02841868309134038>
- [15] Helms, C. A., Major, N. M., Anderson, M. W., Kaplan, P., & Dussault, R. (2008). *Musculoskeletal MRI E-Book*. Philadelphia. Elsevier Health Sciences, 20-24.
- [16] Bell, E. G., McAfee, J. G., & Constable, W. C. (1969). Local radiation damage to bone and marrow demonstrated by radioisotopic imaging. *Radiology*, 92(5), 1083–1088. <https://doi.org/10.1148/92.5.1083>
- [17] Flidner, T. M., Nothdurft, W., & Calvo, W. (1986). The development of radiation late effects to the bone marrow after single and chronic exposure. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*, 49(1), 35–46. <https://doi.org/10.1080/09553008514552211>
- [18] Lam, J., Takeshita, S., Barker, J. E., Kanagawa, O., Ross, F. P., & Teitelbaum, S. L. (2000). TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *The Journal of clinical investigation*, 106(12), 1481–1488. <https://doi.org/10.1172/JCI11176>
- [19] Zaidi, M., Blair, H. C., Moonga, B. S., Abe, E., & Huang, C. L. (2003). Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics. *Journal of bone and mineral*

- research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 18(4), 599–609. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.4.599>
- [20] Hui, S. K., Sharkey, L., Kidder, L. S., Zhang, Y., Fairchild, G., Coghill, K., Xian, C. J., & Yee, D. (2012). The influence of therapeutic radiation on the patterns of bone marrow in ovary-intact and ovariectomized mice. *PloS one*, 7(8), e42668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042668>
- [21] Gallo Vallejo, F. J., Giner-Ruiz, V., & León-Vázquez, F. (2014). *Osteoporosis: Manejo: Prevención, diagnóstico y tratamiento*. Barcelona. Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria.
- [22] World Health Organization. (2007). *WHO Scientific Group on the Assessment of Osteoporosis at Primary Health Care Level*. Geneva. WHO Press.
- [23] Willey, J. S. (2008). *Radiation-induced osteoporosis: bone quantity, architecture and increased resorption following exposure to ionizing radiation*. Clemson. Clemson University, 127-145.
- [24] Sapienza, L. G., Salcedo, M. P., Ning, M. S., Jhingran, A., Klopp, A. H., Calsavara, V. F., Schmeler, K. M., Leite Gomes, M. J., de Freitas Carvalho, E., & Baiocchi, G. (2020). Pelvic Insufficiency Fractures After External Beam Radiation Therapy for Gynecologic Cancers: A Meta-analysis and Meta-regression of 3929 Patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 106(3), 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2019.09.012>
- [25] Elliott, S. P., Jarosek, S. L., Alane, S. R., Konety, B. R., Dusenbery, K. E., & Virnig, B. A. (2011). Three-dimensional external beam radiotherapy for prostate cancer increases the risk of hip fracture. *Cancer*, 117(19), 4557–4565. <https://doi.org/10.1002/cncr.25994>
- [26] Dudziak, M. E., Saadeh, P. B., Mehrara, B. J., Steinbrech, D. S., Greenwald, J. A., Gittes, G. K., & Longaker, M. T. (2000). The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plastic and reconstructive surgery*, 106(5), 1049–1061. <https://doi.org/10.1097/00006534-200010000-00015>

- [27] Szymczyk, K. H., Shapiro, I. M., & Adams, C. S. (2004). Ionizing radiation sensitizes bone cells to apoptosis. *Bone*, 34(1), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.09.003>
- [28] Green, D. E., Adler, B. J., Chan, M. E., & Rubin, C. T. (2012). Devastation of adult stem cell pools by irradiation precedes collapse of trabecular bone quality and quantity. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 27(4), 749–759. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1505>
- [29] Willey, J. S., Lloyd, S. A., Robbins, M. E., Bourland, J. D., Smith-Sielicki, H., Bowman, L. C., Norrdin, R. W., & Bateman, T. A. (2008). Early increase in osteoclast number in mice after whole-body irradiation with 2 Gy X rays. *Radiation research*, 170(3), 388–392. <https://doi.org/10.1667/RR1388.1>
- [30] Nishiyama K, Inaba F, Higashirara T, Kitatani K, Kozuka T. «Radiation osteoporosis – an assessment using single energy quantitative computed tomography.», *Eur Radiol*, vol. 2, pp. 322–325, 1992.
- [31] Komori T. (2015). Animal models for osteoporosis. *European journal of pharmacology*, 759, 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.028>
- [32] Hsu, P. Y., Tsai, M. T., Wang, S. P., Chen, Y. J., Wu, J., & Hsu, J. T. (2016). Cortical Bone Morphological and Trabecular Bone Microarchitectural Changes in the Mandible and Femoral Neck of Ovariectomized Rats. *PloS one*, 11(4), e0154367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154367>
- [33] Barou, O., Valentin, D., Vico, L., Tirode, C., Barbier, A., Alexandre, C., & Lafage-Proust, M. H. (2002). High-resolution three-dimensional micro-computed tomography detects bone loss and changes in trabecular architecture early: comparison with DEXA and bone histomorphometry in a rat model of disuse osteoporosis. *Investigative radiology*, 37(1), 40–46. <https://doi.org/10.1097/00004424-200201000-00008>
- [34] Lin, S., Huang, J., Zheng, L., Liu, Y., Liu, G., Li, N., Wang, K., Zou, L., Wu, T., Qin, L., Cui, L., & Li, G. (2014). Glucocorticoid-induced osteoporosis in growing rats. *Calcified tissue international*, 95(4), 362–373. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9899-7>

- [35] Müller, R. (2003). Bone microarchitecture assessment: current and future trends. *Osteoporos Int* 14, 89–99. <https://doi.org/10.1007/s00198-003-1479-z>
- [36] Silva, A., Alves, J. M., Silva, O., & Silva Junior, N. (2014). Two and three-dimensional morphometric analysis of trabecular bone using X-ray microtomography ( $\mu$ CT). *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, 30(2), 93-101. <https://doi.org/10.1590/rbeb.2014.011>
- [37] Bouxsein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J., & Müller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 25(7), 1468–1486. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>
- [38] Parfitt A. M. (1988). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Summary of proposed system. *Bone and mineral*, 4(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(88\)90029-4](https://doi.org/10.1016/8756-3282(88)90029-4)
- [39] Uchiyama, T., Tanizawa, T., Muramatsu, H., Endo, N., Takahashi, H. E., & Hara, T. (1997). A morphometric comparison of trabecular structure of human ilium between microcomputed tomography and conventional histomorphometry. *Calcified tissue international*, 61(6), 493–498. <https://doi.org/10.1007/s002239900373>
- [40] Fowler J. F. (2010). 21 years of biologically effective dose. *The British journal of radiology*, 83(991), 554–568. <https://doi.org/10.1259/bjr/31372149>
- [41] Dale R. G. (1985). The application of the linear-quadratic dose-effect equation to fractionated and protracted radiotherapy. *The British journal of radiology*, 58(690), 515–528. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-58-690-515>
- [42] Chen, H., & Kuo, M. T. (2017). Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget*, 8(37), 62742–62758. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18409>
- [43] Organismo Internacional de Energía Atómica. (2005). Determinación de la dosis absorbida en radioterapia con haces externos (IAEA-TRS-398). Viena. OIEA.
- [44] Marroquin, E.Y.L., Herrera González, J.A., Camacho López, M.A., Barajas, J.E.V. & García-Garduño, O.A. (2016). Evaluation of the uncertainty in an EBT3 film dosimetry

- system utilizing net optical density. *Journal of Applied Clinical Medical Physics*, 17: 466-481. <https://doi.org/10.1120/jacmp.v17i5.6262>
- [45] Arráns, R., Miras, H., Ortiz-Seidel, M., Terrón, J. A., Macías, J., & Ortiz-Lora, A. (2009). Dosimetría con películas radiocrómicas. *Rev Fis Med*, 10(2), 83-104.
- [46] Hussein, M., Clark, C. H., & Nisbet, A. (2017). Challenges in calculation of the gamma index in radiotherapy - Towards good practice. *Physica medica (AIFB)*, 36, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2017.03.001>.
- [47] Depuydt, T., Van Esch, A., & Huyskens, D. P. (2002). A quantitative evaluation of IMRT dose distributions: refinement and clinical assessment of the gamma evaluation. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 62(3), 309-319. [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(01\)00497-2](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(01)00497-2)
- [48] Berumen-Murillo, F. (2016). Caracterización de un micro-tomografo de rayos-x para estudios preclínicos usando resta de imágenes con medio de contraste (Tesis de Maestría). Ciudad de México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [49] Farncombe, T., & Iniewski, K. (Eds.). (2017). *Medical Imaging: Technology and Applications*. New York. CRC Press, 130-132.
- [50] Yale Histology. Histological Feature of Cells. Recuperado de: <http://histology.med.yale.edu> [Último acceso: Mayo 2020].
- [51] Heiman, G. (2013). *Basic statistics for the behavioral sciences*. Cengage Learning, 291-317.
- [52] NIST/SEMATECH. (2013). *e-Handbook of Statistical Methods*. Recuperado de: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/> [Último acceso: Julio 2020].
- [53] Lee, S., & Lee, D. K. (2018). What is the proper way to apply the multiple comparison test?. *Korean journal of anesthesiology*, 71(5), 353-360. <https://doi.org/10.4097/kja.d.18.00242>
- [54] Willey, J. S., Livingston, E. W., Robbins, M. E., Bourland, J. D., Tirado-Lee, L., Smith-Sielicki, H., & Bateman, T. A. (2010). Risedronate prevents early radiation-induced osteoporosis in mice at multiple skeletal locations. *Bone*, 46(1), 101-111. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.09.002>