

MAPEO DE PARTÍCULAS PESADAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS MEDIANTE TÉCNICAS AUTORRADIOGRÁFICAS

Saint Martin, G.^{1,2} y Portu, A.^{1,3}

¹ Comisión Nacional de Energía Atómica

² Instituto Jorge Sábato, Universidad Nacional de San Martín

³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

RESUMEN

La distribución y localización de un emisor de partículas pesadas en una muestra puede determinarse mediante la imagen autorradiográfica producida en un detector de trazas nucleares de estado sólido (SSNTD). El uso de estos materiales se basa en el hecho de que el daño producido por los iones en su trayectoria en el material es permanente, y puede amplificarse mediante un proceso de ataque químico. Las partículas cargadas se originan en la muestra y de acuerdo a los átomos presentes, pueden ser el producto del decaimiento natural de isótopos inestables (ej. ^{235}U), o el resultado de una reacción nuclear, por ejemplo $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$. Así, las técnicas autorradiográficas son de especial interés en el marco de la Terapia por Captura Neutrónica de Boro (BNCT), una modalidad para el tratamiento del cáncer basada en la acumulación selectiva de compuestos borados en tejido maligno y la subsecuente irradiación con neutrones térmicos. La comparación entre imágenes histológicas y autorradiográficas, correlacionadas espacialmente, permite determinar la ubicación de los átomos de boro en la muestra de tejido (autorradiografía cualitativa, AQL). La concentración de ^{10}B en las diferentes regiones de un corte de tejido puede evaluarse midiendo la densidad de trazas en el detector (autorradiografía cuantitativa, AQT). Existen, además, aproximaciones que permiten obtener una mayor resolución: por un lado, es posible generar contornos del material biológico en la autorradiografía mediante la sensibilización del detector con radiación UV-C. Por otra parte, utilizando láminas de SSNTD extremadamente delgadas se pueden observar simultáneamente secciones de tejido y trazas nucleares, mediante un sistema de protección del tejido para su preservación durante el ataque químico. En nuestro laboratorio hemos desarrollado todas estas aproximaciones de la autorradiografía neutrónica. En este trabajo se las describirá, y se presentarán algunos resultados de su aplicación en el análisis de muestras biológicas provenientes de diferentes protocolos.

1. INTRODUCCIÓN

La ciencia de los detectores de trazas nucleares de estado sólido (Solid State Nuclear Track Detector, SSNTD) nació en 1958, tras la observación, por parte de D. A. Young, de trazas nucleares en un cristal de LiF irradiado con fragmentos de fisión [1]. Desde ese momento, es conocida la capacidad de los SSNTD para registrar el daño producido por partículas cargadas en forma permanente. Existe una gran variedad de materiales aislantes capaces de detectar eventos, ya sea inorgánicos como la mica u orgánicos como ciertos polímeros, que han demostrado ser más sensibles que los materiales inorgánicos para la detección de trazas [2].

Cuando un ión atraviesa un detector de este tipo, se producen alteraciones en el material a lo largo de la trayectoria del proyectil principalmente debido a ionizaciones y excitaciones de los átomos del blanco. Los electrones secundarios producidos, al propagarse dentro de la masa del material provocan a su vez ionizaciones y excitaciones electrónicas. Las reacciones

¹ gisaint@cnea.gov.ar; portu@cnea.gov.ar

que tienen lugar en este estadio generan radicales libres y en el caso de materiales poliméricos degradables, ruptura de las cadenas del mismo. Esta degradación del polímero se traduce en una disminución del peso molecular promedio en la zona circundante a la trayectoria del ión. Este daño latente puede amplificarse a nivel de microscopía óptica, para lo cual el detector es sometido a un proceso de revelado o etching mediante agentes químicos que atacan el material en forma preferencial en la zona dañada, en condiciones que varían según el detector y el reactivo. Así, hay disolución de material y aparición de los “canales” que constituyen las trazas visibles al microscopio [3].

Los SSNTD se han aplicado en diversas áreas de la ciencia y la tecnología [4], como ser la dosimetría personal de neutrones [5], estudios de exposición ocupacional de mineros [6], etc. Una de las aplicaciones de estos detectores es la realización de autorradiografías de “objetos” que contengan elementos emisores de partículas cargadas (^{238}U , por ej.), o elementos que sometidos a algún tipo de reacción nuclear (^{10}B , por ej.), generen partículas cargadas. Estos objetos, puestos en contacto con un material detector de trazas podrán producir una imagen de las regiones del mismo donde se alojan los elementos emisores en cuestión, a partir de la observación de las trazas de las partículas emitidas. Una autorradiografía es, entonces, una imagen obtenida sobre un material sensible al ser puesto en contacto con una muestra que contiene un elemento emisor. Ésta impresiona el material y revela así su distribución en la muestra.

Este mecanismo es el que puede utilizarse en el caso de tener muestras de cortes de tejido en el que se halle presente por ejemplo ^{10}B y se desee registrar la localización y distribución del mismo en distintas regiones del corte [7]. Si el ^{10}B presente en la muestra (en contacto con la lámina detectora) absorbe un neutrón de baja energía, emite una partícula alfa y un ión Li ($E = 1.47\text{MeV}$ y 0.84 MeV , respectivamente) de retroceso que al incidir en el material detector, serán los responsables de producir las trazas latentes. La reacción de captura entre ^{10}B y neutrones térmicos es el fundamento de la Terapia por Captura Neutrónica de Boro (BNCT), una modalidad de tratamiento para el cáncer en la cual un compuesto rico en el isótopo ^{10}B se acumula en forma preferencial en células malignas y la región a tratar es irradiada con un flujo de neutrones térmicos. Las partículas generadas a partir de la reacción de captura neutrónica $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ tienen alta transferencia lineal de energía y corto rango en tejido, pudiendo destruir idealmente las células tumorales, sin producir daño significativo en el tejido sano circundante [8].

En el marco del Proyecto BNCT, entonces, la autorradiografía se desarrolló con el objeto de proveer información acerca de la microdistribución de ^{10}B en tejidos, tanto de pacientes como provenientes de modelos animales. Por su parte, es de interés analizar muestras biológicas que contengan ^{238}U (emisor de partículas alfa de $E = 4.27\text{ MeV}$), en función de futuras aplicaciones relativas al estudio de la toxicidad de uranio.

2. APROXIMACIONES DE LA TÉCNICA AUTORRADIOGRÁFICA

En nuestro laboratorio, hemos desarrollado diferentes aproximaciones de la autorradiografía, basándonos en el uso de un material detector de trazas nucleares que presenta propiedades más convenientes para el análisis de autorradiografías de muestras biológicas, con respecto a los utilizados habitualmente. Se trata del policarbonato LexanTM que, en particular, tiene una sensibilidad adecuada para revelar el daño producido por las partículas emitidas en la

reacción de captura neutrónica de ^{10}B . Optimizando las condiciones de irradiación, procesamiento químico y visualización de las muestras, se han logrado imágenes claras, evitando la contribución de las trazas producidas, por ejemplo, por los protones emitidos en la reacción de captura con el isótopo ^{14}N del nitrógeno (elemento abundante en tejidos biológicos). En detectores de mayor sensibilidad (como poli alil diglicol, PADC) las trazas de estas partículas constituyen la principal contribución al fondo, mientras que la sensibilidad del Lexan resulta adecuada para muestras provenientes de protocolos de BNCT [9].

Las soluciones utilizadas habitualmente para el ataque químico de detectores poliméricos son de tipo alcalino. En el caso del policarbonato, el agregado de alcohol etílico a la solución provoca un aumento en la efectividad de detección de trazas, siendo las condiciones óptimas del proceso: solución PEW (30 g KOH + 80 g alcohol etílico + 90 g agua destilada) a 70 °C [10]. Con este revelado, es posible amplificar las trazas a un tamaño adecuado para su visualización por microscopía óptica en un tiempo corto. En la Figura 1 se observan imágenes de trazas provenientes de soluciones acuosas con contenido de ^{238}U y ^{10}B , respectivamente. Se verifica que el tamaño de las trazas depende del tiempo de etching, además de las características de las partículas incidentes.

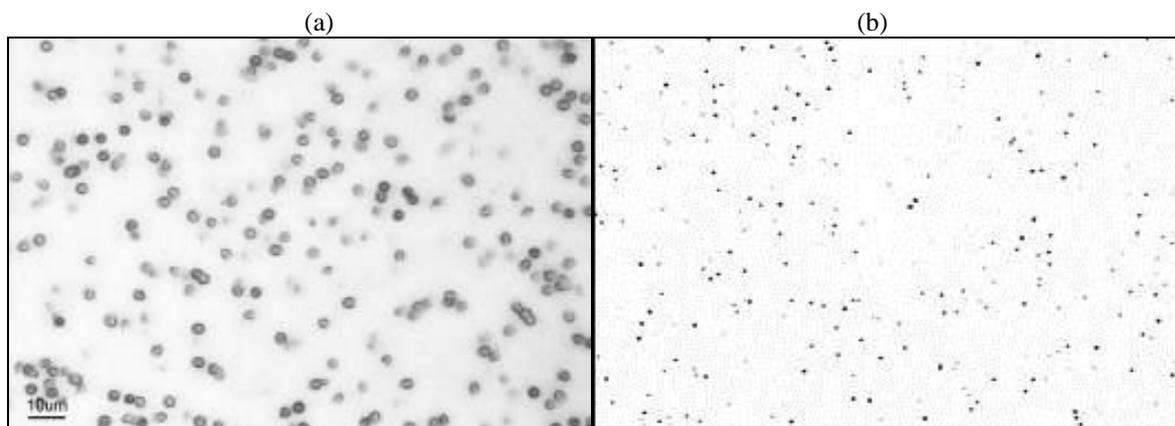


Figura 1. Trazas nucleares sobre Lexan en contacto con (a) solución de nitrato de uranilo (10 min de etching) y (b) solución de ácido bórico (2 min de etching).

2.1. AUTORADIOGRAFÍA CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

Dependiendo de la concentración del elemento emisor de partículas y las condiciones de etching, las trazas pueden observarse lo suficientemente separadas como para permitir la medición de la densidad de trazas (por conteo de las mismas) y la evaluación de la concentración del elemento por medio de un sistema de calibración (autorradiografía cuantitativa, AQT) [11]. Variando estas condiciones, también es posible obtener imágenes autorradiográficas con una gran densidad de trazas, pudiéndose evaluar en forma cualitativa las diferencias en los niveles de grises, y así brindar información valiosa sobre la distribución espacial del elemento (autorradiografía cualitativa, AQL) [12].

En un estudio de biodistribución para BNCT, el animal de experimentación (o el paciente) es inyectado con un compuesto borado. Luego de la infusión, debe esperarse un intervalo de tiempo antes de extraer la muestra, con el objeto de permitir que los átomos de ^{10}B alcancen las células tumorales. Este tiempo depende del mecanismo de transporte del compuesto borado, del protocolo de administración, etc. Una vez resecado, el tejido es fijado inmediatamente en nitrógeno líquido (N_2 (l $\acute{\text{ı}}\text{q}$)), con el objeto de evitar la migración de los átomos de boro de sus sitios originales, permitiendo una evaluación realista de su distribución. Las piezas se seccionan en un micrótopo criostático, realizándose cortes de alrededor de 10 μm y 30 μm de espesor consecutivamente. Los más delgados se depositan sobre portaobjetos para realizar un análisis histológico, tras una tinción estándar de hematoxilina-eosina (H&E).

Las muestras más gruesas se montan sobre los detectores de trazas nucleares, en este caso folias de LexanTM de 250 μm de espesor. Las secciones montadas sobre el SSNTD son irradiadas con neutrones en la facilidad de columna térmica del reactor nuclear RA-3 (CAE, Ezeiza). De acuerdo al tipo de análisis que se desee realizar, las muestras pueden irradiarse con dos fluencias diferentes: 10^{12} n.cm⁻² para la cuantificación de ^{10}B (AQT), y 10^{13} n.cm⁻² para AQL. El flujo neutrónico se mide previamente utilizando un SPND (Self Powered Neutron Detector) y la incerteza en la fluencia de neutrones es del 8%. Durante la irradiación de las folias, el flujo es monitoreado en ciertos puntos de referencia a fin de comprobar la estabilidad [13].

Una vez irradiadas, las folias se marcan con un taladro portátil. Estos orificios, de 0.5 mm de diámetro, sirven para establecer puntos de referencia para corte histológico, como se observa en la Figura 2. Este sistema de marcación permite una buena ubicación de las zonas de interés en la imagen autorradiográfica.

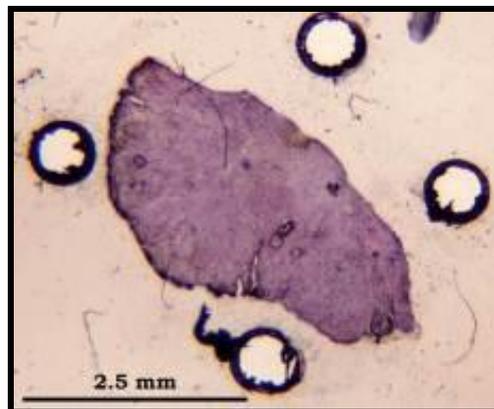


Figura 2. Ejemplo de las marcas realizadas en una folia con un corte histológico de tumor de la bolsa de hámster (1.25x). Coloración: hematoxilina.

Luego las folias que serán procesadas se colorean con H&E, habiéndose comprobado que el detector no se altera (ni las trazas latentes), aunque la sección quede coloreada en forma permanente. La sección de tejido se fotografía con bajo aumento (1.25x o 2.5x), con el objeto de obtener imágenes de la totalidad del corte. También se realiza una exploración del corte, utilizando el sistema de coordenadas y fotografiando regiones específicas con mayor aumento. Estas observaciones histológicas pueden corroborarse con el corte consecutivo montado sobre vidrio.

Luego, el tejido es removido de las folias utilizando tripsina-EDTA, y éstas son procesadas con solución PEW a 70 °C. Las muestras para AQT se atacan químicamente durante 2 min, mientras que las destinadas a AQL, por 6 min. Un tiempo de etching más prolongado permite una amplificación del diámetro de las trazas, incrementándose la superposición y el contraste de la imagen.

Las folias se observan y fotografían nuevamente, buscando las zonas delimitadas en el análisis histológico previo, buscando reproducir lo más fielmente posible la posición en la que se tomaron las primeras fotografías, para capturar el mismo campo y conservar la orientación del corte en la figura. Para la cuantificación global de ^{10}B , se toman 50 fotografías al azar, recorriendo todo el corte. A partir del análisis de la densidad de trazas en Lexan se pueden obtener valores de concentración de boro, utilizando el sistema de calibración para la cuantificación de ^{10}B desarrollado en nuestro laboratorio [11].

A continuación, se presenta un esquema que resume el proceso descrito para AQT. Para AQL, los últimos tres pasos se reemplazan por la toma de fotografías de bajo aumento de la imagen autorradiográfica y su posterior exploración.



Figura 3. Esquema de la metodología para cuantificar ^{10}B por AQT.

2.1.1. Ejemplo de aplicación

La técnica descrita se ha utilizado para el análisis de la microdistribución de ^{10}B en diferentes muestras provenientes de diferentes protocolos, tales como tumores de ratones

nude provenientes de un modelo de melanomas cutáneos [14]; tumores y tejido circundante en la bolsa de la mejilla del hámster (ej. [15]), etc.

El modelo de la bolsa de la mejilla del hámster ha sido desarrollado y aplicado ampliamente para estudiar la radiobiología de BNCT en cáncer bucal [16]. En la Figura 4 se observan ejemplos de AQL (histología y autorradiografía) correspondiente a diferentes compuestos para tumor y tejido premaligno: borofenilalanina (BPA) y decahidrodecaborato de sodio (GB-10). Se analizaron las siguientes regiones de interés: parénquima (células neoplásicas, P) y estroma (tejido de sostén, E) en muestras de tumor, y epitelio, tejido conectivo y músculo en muestras de tejido premaligno y normal.

Las autorradiografías de las muestras control presentan un número reducido de trazas, mientras que para las muestras de protocolos de BPA y GB-10 las imágenes autorradiográficas muestran una distribución inhomogénea de boro. A partir del análisis de las mismas se pudo comprobar que el BPA se acumula preferencialmente en el parénquima tumoral, de acuerdo con su transporte activo, y que el GB-10 tiene una distribución heterogénea, acumulándose preferencialmente en el estroma. De todas formas, su heterogeneidad es menos marcada que la del BPA. De un análisis similar en tejido premaligno y normal, se determinó que el ^{10}B se acumula preferencialmente en el epitelio cuando el compuesto administrado es BPA, mientras que las zonas de mayor concentración corresponden al tejido conectivo en el caso de GB-10. El análisis de AQT permitió definir el índice P/E, y cuantificarlo, obteniéndose los valores 0,7 para GB-10 y 2,2 para BPA.

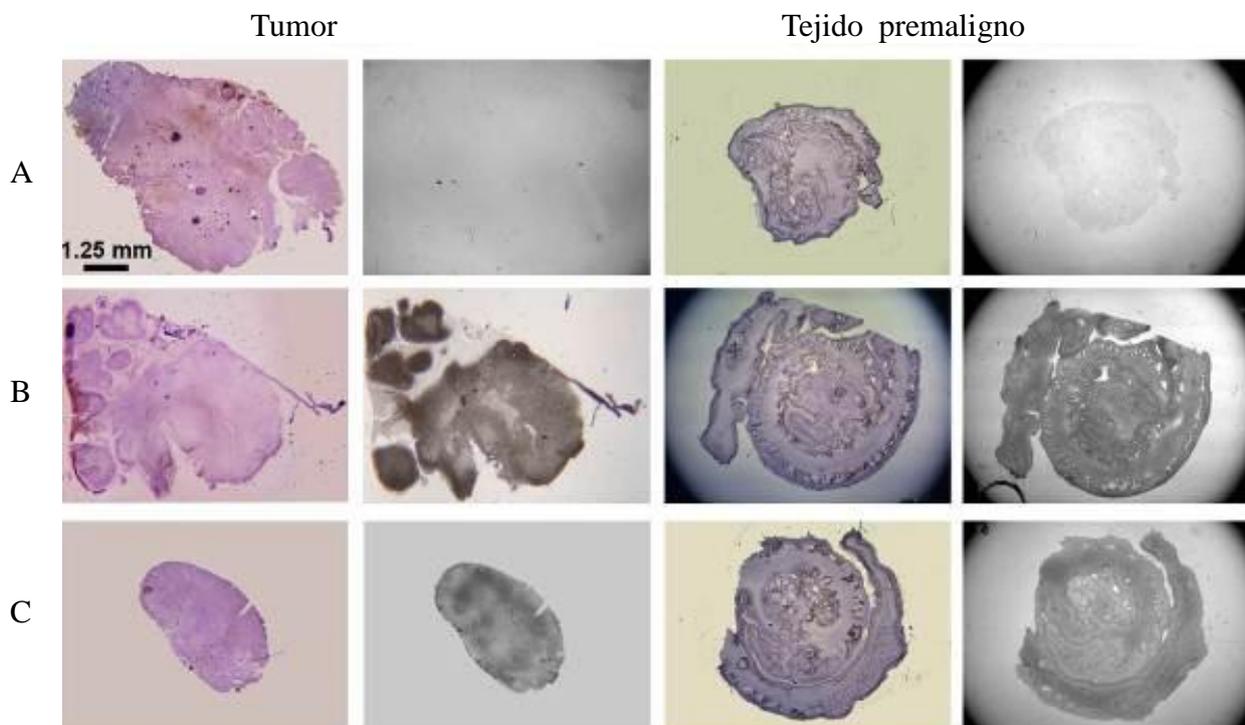


Figura 4. Cortes de tumor y tejido premaligno coloreados con hematoxilina-eosina y sus imágenes autorradiográficas correspondientes, para los protocolos: A) control (sin boro); B) BPA y C) GB-10.

2.2. FORMACIÓN DE IMPRONTAS POR SENSIBILIZACIÓN CON UV-C

Un aspecto crítico de la técnica descrita es la correlación entre la posición de emisión (sobre una imagen óptica) y la posición del impacto registrado sobre el SSNTD ya que luego de la irradiación y exploración del corte histológico, la muestra es separada del detector, a fin de atacarlo químicamente. A pesar de que se utilizan marcas de referencia para preservar la posición, este procedimiento implica que la correlación entre el sitio de emisión y la posición de la traza correspondientes podrá ser determinada con una precisión limitada. Dicha correlación espacial depende de diversos factores que deben ser considerados conforme a la escala espacial de interés (mm ó μm).

En trabajos de Konishi y colaboradores (ej. [17]) se ha reportado la generación de una “impronta” de la muestra biológica en la superficie de la folia detectora que sea revelable por el mismo proceso de ataque químico utilizado para desarrollar las trazas nucleares originadas por los átomos de boro presentes en la muestra, utilizando detectores de CR39 (PADC). En nuestro laboratorio, hemos estudiado la factibilidad de obtener imágenes de trazas nucleares superpuestas a improntas de material biológico en detectores de policarbonato (Lexan™) [18], interponiendo una etapa de exposición de las muestras a radiación UV-C (254 nm) entre la irradiación con neutrones y la coloración de las muestras.

Determinamos las condiciones experimentales óptimas a fin de observar en forma simultánea imágenes de células cultivadas en este detector y las trazas producidas por la reacción de captura por los átomos de boro dentro de las células, con un método de observación por microscopía óptica. Se encontraron las condiciones más favorables de cultivo en la superficie de las láminas de policarbonato. Del análisis comparativo de las imágenes, se concluyó que tanto las improntas celulares como las trazas nucleares presentan mayor definición y tamaño para 6 hs de exposición UV C y 4 min de etching (Figura 5). Se estudió un modelo experimental de melanoma in vitro y se logró cuantificar la captación de boro dentro de las células, determinando que las células MEL-J tienen un factor de captación de BPA de tres respecto a la concentración de incubación.

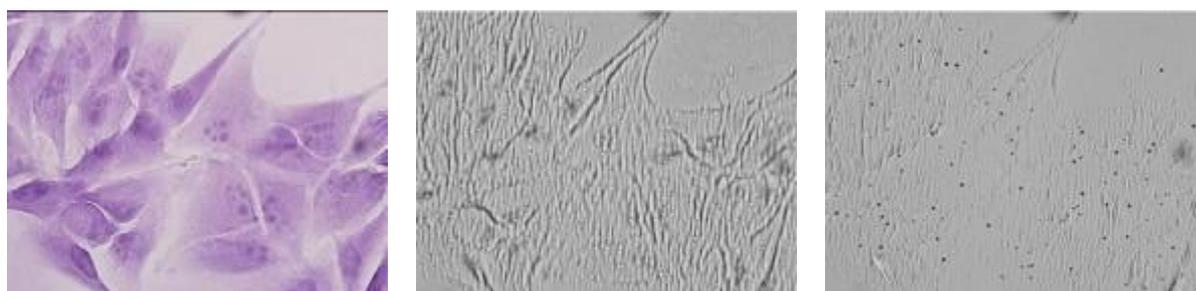


Figura 5. a) cultivo de MEL J coloreado con hematoxilina (40x). b) Improntas celulares. c) Mismo campo que (b), haciendo foco con trazas nucleares.

Esta técnica se extendió para el análisis de secciones de tejido y se determinó que sólo con 10 min de exposición UV-C se logra visualizar la impronta de tejido con un detalle de las estructuras adecuado (Figura 6).

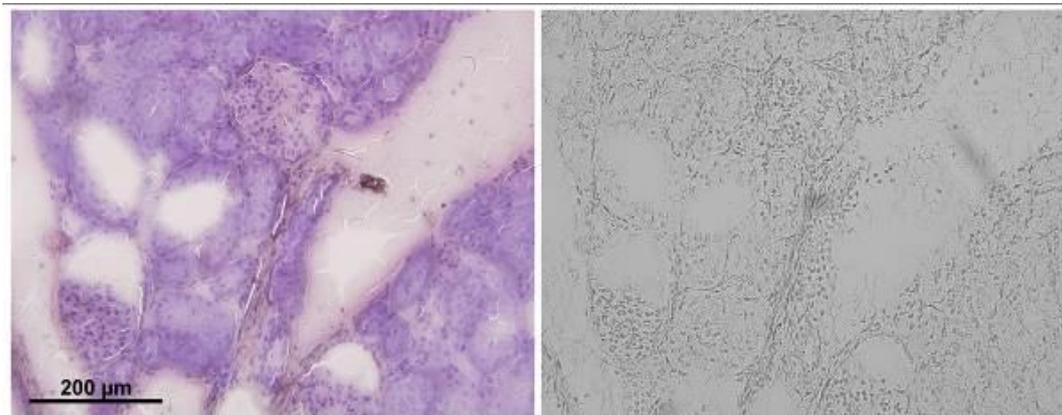


Figura 6. sección de riñón de rata BDIX y su imagen de impronta correspondiente.

2.3. AUTORADIOGRAFÍA CON LÁMINAS DELGADAS DE SSNTD

La correlación entre la distribución de trazas en el detector y su localización espacial en el tejido será aún más precisa si ambas estructuras son observadas en el microscopio en forma simultánea. Se han reportado resultados del análisis de las imágenes autoradiográficas con alta resolución (HRQAR), del orden de 1 μm [19]. Esta metodología permitiría una visualización de la distribución de trazas (y por consiguiente del elemento emisor presente en el tejido) incluso a nivel subcelular. Para ello, es necesario que el espesor del detector sea muy pequeño a fin de que las trazas se generen en una de sus caras (en contacto con el tejido) pero puedan ser observadas en la cara opuesta, luego del ataque químico. Un detector de espesor mucho mayor que el rango de las partículas a observar implicaría tiempos muy largos de revelado, aumentando el riesgo de daño de la muestra sin poder asegurar que la sustancia de revelado actúe en forma constante.

La puesta a punto y optimización de la técnica de visualización simultánea de cortes de tejido y de trazas nucleares tiene asociadas una serie de dificultades, entre las que se encuentra la necesidad de proteger el tejido durante el proceso de etching, a fin de preservar la muestra durante el proceso de etching. En las experiencias preliminares realizadas hasta el momento, láminas de Lexan de 10 μm fueron fijadas en soportes de polipropileno. Se colocó una gota de solución de $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ sobre cada detector, y luego la lámina protectora de acetato de PVC. Se practicaron improntas de células de hígado sano de ratas Wistar sobre el sector de la gota [20]. Las mismas fueron coloreadas con hematoxilina y protegidas con un cubreobjetos sellado con vidrio líquido. En la Figura 7 pueden observarse, en forma simultánea, células y trazas. Se procesaron las muestras con solución PEW a 56° C, durante 30 minutos.

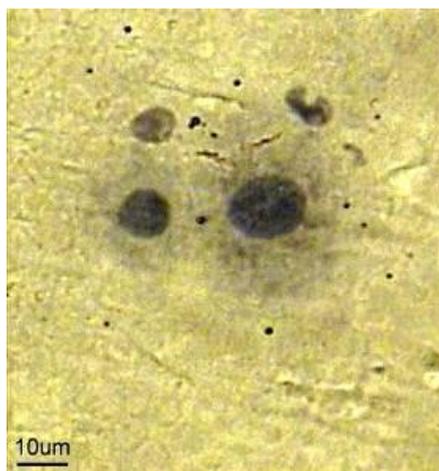


Figura 7. Fotografías de una muestra tomada con un objetivo de 40X. Se observa una región donde las células hepáticas y las trazas nucleares están superpuestas.

3. CONCLUSIONES

Todas las etapas para la generación y cuantificación de imágenes autorradiográficas provenientes de muestras biológicas fueron estudiadas, a fin de optimizar el proceso y asegurar la obtención de resultados confiables. Se han establecido las condiciones de irradiación, revelado y observación para todas las aproximaciones de la autorradiografía estudiadas (AQLAQT, UV-C y HRQAR), que proveen información complementaria.

La autorradiografía está disponible para ser utilizada para el análisis de la distribución espacial y cuantificación de ^{10}B en tejidos, proveyendo información relevante en el marco de BNCT. Por otra parte, la metodología podrá aplicarse al análisis de otros elementos emisores, además del ^{10}B . Toda reacción que implique la emisión de partículas pesadas que puedan ser registradas por un SSNTD podrá ser analizada por alguna de las técnicas autorradiográficas descriptas.

4. REFERENCIAS

1. Young, D.A., "Etching of radiation damage in lithium fluoride", *Nature* **182**, pp.357-377 (1958).
2. Nikezic, D., Yu, K.N., "Formation and growth of tracks in nuclear track materials", *Mater. Sci. Eng. R* **46**, pp.51-123 (2004).
3. Fleischer, R.L., Price, P., Walker, R.M., *Nuclear Tracks in Solids*, University of California Press, Berkeley, USA (1975).
4. Khan, H.A., Qureshi, I.E., "SSNTD aplicaciones in science and technology – a brief review". *Rad. Meas.* **31**, pp.25-36 (1999).
5. Djeflal, S., Lounis, Z., Allab, M., Izerrouken, M., "Further investigations on CR-39 fast neutron personal dosimeter". *Nucl. Instr. Meth. Phys. A* **398**(2), pp.343-350 (1997).
6. Morris, K.J., Batchelor, A.L., "The location of boron-containing dust in the lung, utilising neutron-induced autoradiography techniques with a CR-39 solid state track detector", *Phys. Med. Biol.* **32**(11), pp.1501-1508 (1987).

7. Thellier, M., Dérue, C., Tafforeau, M., Le Sceller L., Verdus, M.C., Massiot, P., Ripoll, C., “Physical methods for in vitro analytical imaging in the microscopic range in biology, using radioactive or stable isotopes (review article)”. *J. Trace Microprobe. T.* **19**, pp.143-162 (2001).
8. Barth, R.F., Vicente, M.G., Harling, O.K., Kiger, W.S. 3rd, Riley, K.J., Binns, P.J., Wagner, F.M., Suzuki, M., Aihara, T., Kato, I., Kawabata, S., “Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer”. *Radiat Oncol* **7**, pp.146 (2012).
9. Saint Martin, G., Portu, A., Santa Cruz, G.A., Bernaola, O.A., “Stochastic simulation of track density in nuclear track detectors for ^{10}B measurements in autoradiography”, *Nucl. Instr. Meth. Phys. B* **269**, pp.2781-2785 (2011).
10. Somogyi, G., Grabisch, K., Scherzer, R., Enge, W., “Revision of the concept of registration threshold in plastic track detectors”, *Nucl. Instrum. Meth.* **134**, pp.129-141 (1976).
11. Portu, A., Bernaola, O.A., Nievas, S., Liberman, S., Saint Martin, G., “Measurement of ^{10}B concentration through autoradiography images in polycarbonate nuclear track detectors”, *Rad. Meas.* **46**, pp.1154-1159 (2011).
12. Portu, A., Carpano, M., Dagrosa, A., Cabrini, R.L., Saint Martin, G., “Qualitative autoradiography with polycarbonate foils enables histological and track analyses on the same section”, *Biotech. Histochem.* **88**, pp.217-221 (2013).
13. Miller, M., Quintana, J., Ojeda, J., Langan, S., Thorp, S., Pozzi, E., Szejnberg, M., Estryk, G., Nosal, R., Saire, E., Agrazar, H., Graiño F., “New irradiation facility for biomedical applications at the RA-3 reactor thermal column”, *Appl. Radiat. Isot.* **67**, pp.S226-229 (2009).
14. Portu, A., Carpano, M., Dagrosa, A., Nievas, S., Pozzi, E., Thorp, S., Cabrini, R.L., Liberman, S., Saint Martin, G., “Reference systems for the determination of ^{10}B through autoradiography images: Application to a melanoma experimental model”, *Appl. Radiat. Isot.* **69**, pp.1698-1701 (2011).
15. Molinari, A.J., Thorp, S.I., Portu, A.M., Saint Martin, G., Pozzi, E.C., Heber, E.M., Bortolussi, S., Itoiz, M.E., Aromando, R.F., Monti Hughes, A., Garabalino, M.A., Altieri, S., Trivillin, V.A., Schwint, A.E., “Assessing advantages of sequential boron neutron capture therapy (BNCT) in an oral cancer model with normalized blood vessels”, *Acta Oncol.* **54**, pp.99-106 (2015).
16. Kreimann, E., Itoiz, M., Longhino, J., Blaumann, H., Calzetta, O., Schwint, A., “Boron Neutron Capture Therapy for the Treatment of Oral Cancer in the Hamster Cheek Pouch Model”, *Cancer Res.* **61**, pp.8638-8642 (2001).
17. Konishi, T, Amemiya, K., Natsume, T., Takeyasu, A., Yasuda, N., Furusawa, Y., Hieda, K., “A new Method for the Simultaneous Detection of Mammalian Cells and Ion Tracks on a Surface of CR 39.” *J. Radiat. Res.* **48**, pp.255-261 (2007).
18. Portu, A., Rossini, A., Gadan, M., Bernaola, O.A., Thorp, S.I., Curotto, P., Pozzi, E.C., Saint Martin, G., Cabrini, R.L., “Experimental set up for the irradiation of biological samples and nuclear track detectors with UV C”, *RPOR* (2015). Ahead of print.
19. Solares, G.R., Zamenhof, R.G., “A Novel Approach to the Microdosimetry of Neutron Capture Therapy. Part I. High Resolution Quantitative Autoradiography Applied to Microdosimetry in Neutron Capture Therapy”, *Radiat. Res.* **144**, pp.50-58 (1995).
20. Portu, A., Saint Martin, G., Bernaola, O.A., Cabrini, R.L., “Aportes para la observación simultánea de cortes de tejido y de trazas nucleares en detectores poliméricos”. *XXXV Reunión Anual de la Asociación Argentina de Tecnología Nuclear*, Buenos Aires, Argentina, 10-14 de Noviembre (2008).