



MX0400359

Congreso Internacional Conjunto Cancún 2004 LAS/ANS-SNM-SMSR/International Joint Meeting Cancun 2004 LAS/ANS-SNM-SMSR
XV Congreso Anual de la SNM y XXII Reunión Anual de la SMSR/XV SNM Annual Meeting and XXII SMSR Annual Meeting
Cancún, Q.R., México, 11-14 de Julio, 2004/Cancún, Q.R., Mexico, July 11-14, 2004

Curvas de Calibración para Dosimetría Biológica

Citlali Guerrero Carbajal y Matilde Breña Valle
Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
km. 36.5, Carrera México-Toluca
cgc@nuclear.inin.mx; mbv@nuclear.inin.mx

Resumen

La información generada por las investigaciones en diferentes laboratorios del mundo, incluido el ININ, en la que se establece que cierta clase de lesiones cromosómicas aumenta en función de la dosis y tipo de radiación, ha dado por resultado la obtención de curvas calibradas que se aplican en la técnica conocida como *dosimetría biológica*. En este trabajo se presenta una recopilación del trabajo efectuado en el laboratorio, que incluye las curvas calibradas para radiación gamma de $^{60}\text{cobalto}$ y rayos X de 250kVp, ejemplos de presunta exposición a radiación ionizante, resueltos mediante análisis de aberraciones y la correspondiente estimación de dosis a través de las ecuaciones de las curvas respectivas y por último una comparación entre los cálculos de dosis en las personas afectadas por el accidente de Ciudad Juárez, realizados por el grupo de Oak Ridge, EUA y los obtenidos en este laboratorio.

1. INTRODUCCIÓN

La amplia utilización de diversas fuentes de radiación y rayos X con fines clínicos, industriales agrícolas, de investigación y militares aumenta el riesgo de sobre-exposición a este agente especialmente por el personal que labora en estos campos y en menor grado por la población en general. La radiación ocasiona rupturas en el ADN que se expresan como lesiones cromosómicas de diverso tipo. Sin embargo de entre todas ellas, la que se conoce como dicéntrico es la que se utiliza como indicador de daño. Esta estructura como su nombre lo indica, se distingue porque posee dos centrómeros ya que en su formación están involucrados al menos dos cromosomas lo que implica que debe haber dos rompimientos. Como el número de dicéntricos aumenta en función de la dosis, se han elaborado curvas dosis respuesta a partir de estudios *in vitro* en linfocitos humanos irradiados con los diferentes tipos de radiación ionizante y en la actualidad, diversas instituciones del mundo, cuentan con gráficas de dosis respuesta calibradas en referencia a las que se tienen en el OIEA [1]. El intervalo de sensibilidad del sistema se localiza entre 0.1 y 4.0 Gy, pero además hay que tomar en cuenta otros factores importantes para el cálculo de dosis, como el tiempo de exposición y si ésta es parcial o a cuerpo entero.

A principios de 2003, tomando en cuenta toda la información recopilada por diferentes laboratorios de dosimetría en el mundo, se preparó un esquema para la estandarización internacional de éstos así como de la metodología asociada [2].

El primer requisito para un laboratorio de dosimetría biológica es que cuente con sus propias curvas de dosis respuesta para distintos tipos y calidades de radiación. Así cada curva generada se calibra con otras similares preparadas con anterioridad por el Organismo Internacional de Energía Atómica y constituye la referencia indispensable para establecer la dosis absorbida en casos de sobre-exposición. A la fecha en el ININ se cuenta ya con las curvas correspondientes a radiación γ de ^{60}Co [3] y para rayos X de distintas energías [4 y 5]. Al presente se está trabajando en la irradiación de células con neutrones para la elaboración de las curvas correspondientes con lo que se dispondrá de una amplia variedad de curvas dosis-respuesta para atender cualquier tipo de eventualidad que se pudiera presentar.

Este trabajo incluye los avances en cuanto curvas calibradas para radiación γ de ^{60}Co [3] y para rayos X de 250kVp, así como su aplicación en la resolución de casos específicos. Ambas son las más utilizadas en situaciones de sobre-exposición, debido a las actividades que en general se desarrollan en la industria y en la clínica.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1. Obtención de Muestra

La muestra de sangre se toma por punción en la vena de un voluntario sano, procurando que el volumen de sangre sea suficiente para tener un mínimo de 4 ml por punto de la curva, incluyendo al testigo sin irradiar, utilizando tubos con heparina de litio, tapón de goma y al vacío (sistema Vacutainer de Becton Dickinson). Para la irradiación de las muestras se utilizan las fuentes del Departamento de Metrología del ININ.

2.2.1. Condiciones de irradiación gamma ^{60}Co

Razón de dosis: $0.84 \text{ Gy}/\text{min}^{-1}$

Fuente de ^{60}Co , Puridec (Amersham International)

Actividad: 2000 Curies o 74 Tera-becquerels

Medidor de dosis: Cámara de ionización Nuclear Enterprises tipo 2581, de 0.6cc, conectada a un dosímetro Farmer tipo 2570

Distancia de la fuente: 56 cm

Temperatura de irradiación: 20°C

2.2.2. Condiciones de irradiación rayos X 250kVp

Equipo de rayos X Phillips MCN321, con generador de 160 kV. Para obtener un haz de rayos X de 250 kVp se utilizó un filtro inherente de 4mm de berilio y filtración adicional de 3.679 mm de cobre. La calidad del haz de la capa hemirreductora es de 3.2 mm de cobre.

Corriente en el tubo 10 mA.

Razón de dosis: $0.332 \text{ Gy}/\text{min}$

Medidor de dosis: Cámara de referencia PTW tipo W 30001 serie 365, electrómetro asociado PTW-unidos tipo 10002 serie 20085.

Distancia de la fuente: 100 cm

2.3. Cultivo y Cosecha de Linfocitos Irradiados

Para separar a los leucocitos del resto de las células sanguíneas, por cada 2 ml de sangre se adiciona 1.0ml de suero fetal de ternera y 150 µl de fitohemaglutinina que estimula la división celular. Se centrifuga durante 5 minutos a 500 rpm, se recupera el sobrenadante con los leucocitos y se siembran en medio mínimo esencial con 2mM de L-glutamina, 200 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 20 unidades/ml de heparina de sodio y 20 µM de 5-bromo-2-desoxiuridina. Todo se incuba durante 48 horas a 37°C y 2 horas antes de cumplirse este período, se agregan 150µl de colchicina para interrumpir la división celular en metafase.

Las metafases se aíslan por tratamiento hipotónico en KCl 0.75 M durante 7 minutos a 37°C y a continuación se hacen tres cambios con solución fijadora **3:1** de metanol:ácido acético. Se pueden almacenar en el fijador a -20°C hasta el momento de necesitarse.

Para efectuar dosimetría individual se sigue un procedimiento similar al anterior tomando 5ml de sangre por cada individuo y desde luego, omitiendo cualquier tipo de irradiación [6].

2.4. Preparación de Laminillas por el Método de Fluorescencia y Giemsa (FYG)

El método para teñir los cromosomas utiliza dos colorantes. Las laminillas se sumergen primero en solución 0.5 mg/ml de colorante Hoechst 33258 durante 20 min. Se enjuaga con agua destilada, se agregan 2 a 3 gotas de solución de Hoechst y se expone a luz ultravioleta por 20 min. Más adelante se efectúa la segunda tinción con solución Giemsa al 5% durante 5 min. El montaje se realiza previa deshidratación en xileno y pasadas 24 horas puede iniciarse el análisis al microscopio.

2.5. Análisis de Metafases

Para localizar las metafases adecuadas con sus 46 cromosomas bien separados, se examinan las laminillas utilizando el objetivo de bajo aumento del microscopio. A continuación, para el análisis de daño cromosómico representado por dicéntricos y sus correspondientes fragmentos, se cambia al objetivo de mayor aumento. Se registran los datos y se alimentan a un programa de computadora que efectúa los cálculos para elaborar la curva de dosis respuesta de acuerdo al número de aberraciones cromosómicas en función de las dosis de radiación aplicadas. Si se requiere dilucidar dosis de exposición se examinan de 500 a 1000 metafases, se cuentan las lesiones y se refieren a la curva calibrada para el tipo de radiación al que presuntamente se expuso el sujeto.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Para la elaboración de la curva calibrada o para estimación de la dosis individual se parte del supuesto de que la relación entre el daño cromosómico (**Y**) y la dosis (**D**) se describe mediante la ecuación:

$$Y = c + \alpha D + \beta D^2 \quad (1)$$

Donde:

Y = frecuencia de dicéntricos por célula

D = dosis

c = control de frecuencia basal

α = coeficiente

β = coeficiente

Lo anterior supone que para formar un dicéntrico se necesita: **1)** que dos cromosomas presenten rupturas dobles, es decir, en ambas cromátidas y **2)** que haya intercambio entre ambos. Los coeficientes se refieren respectivamente a una de dos posibilidades, (**α**) que una trayectoria o traza de ionización produzca dos lesiones en dos cromosomas distintos o (**β**) que cada lesión sea producto de dos trazas independientes. La ecuación describe casos en que la dosis se debe a una exposición aguda, a cuerpo entero [1]. Para situaciones de exposición crónica se debe tomar en cuenta ciertos factores de corrección [3].

En la Tabla I se presenta el número de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos irradiados con dosis crecientes de rayos X de 250 kVp. La frecuencia de dicéntricos es función de la dosis (Figura 1) y coincide con lo anteriormente publicado por diversos laboratorios [1]. Hay una ligera dispersión en los puntos correspondientes a 2 y 4 Gy, pero aún así corresponden a lo esperado para una distribución de Poisson donde el control de frecuencia basal y los coeficientes para esta curva son:

$$c = 0.00072160 \pm 0.0007837$$

$$\alpha = 0.038275 \pm 0.0090410$$

$$\beta = 0.060720 \pm 0.0046011$$

$$X^2 = 4.47 \text{ con } 8 \text{ grados de libertad}$$

Tabla I. Análisis citogenético de linfocitos tratados con rayos X de 250 kVp.

Dosis	Células Analizadas	Células Normales	Dicéntricos	Acéntricos	Frecuencia dicéntricos	(σ)*	Frecuencia acéntricos	(σ)*
0	1000	989	1	11	0.001	0.001	0.011	0.0033
0.05	500	497	1	2	0.002	0.002	0.004	0.002
0.1	700	696	3	1	0.0042	0.0025	0.0014	0.001
0.2	500	492	4	3	0.008	0.004	0.006	0.003
0.5	700	671	21	8	0.03	0.006	0.011	0.004
0.75	600	547	40	16	0.066	0.01	0.026	0.003
1.0	500	478	55	24	0.11	0.015	0.048	0.009
1.5	500	384	98	37	0.196	0.019	0.074	0.012
2.0	600	381	192	71	0.32	0.023	0.118	0.014
3.0	300	110	213	77	0.71	0.048	0.25	0.029
4.0	250	50	260	90	1.04	0.06	0.36	0.038

* (σ): error estándar.

Los grados de libertad en esta curva son mayores que la X^2 lo cual a su vez incrementa los valores del error estándar de α (aproximadamente 25%), ya considerados e incluidos en este análisis (Figura 2). La diferencia es estadísticamente alta, así que cuando se aplique para

incidentes específicos de exposición, será necesario considerar los límites inferiores de cada uno de los parámetros de la ecuación. Sin embargo y dado que en el intervalo entre 0.05 y 1 Gy todavía falta analizar más metafases, se piensa que una vez que aumente el número de células examinadas, se reducirá el tamaño del error estándar. La contribución mayor al valor de X^2 son los puntos de 3 y 4 Gy. Al graficar se puede observar que el primero es ligeramente alto, mientras que el segundo es ligeramente bajo así que entre ambos se da un buen balance para la curva. Los 9 puntos restantes se ajustan perfectamente bien a lo esperado.

Las Figuras 1 y 2 muestran la frecuencia de dicéntricos en función de dosis crecientes de rayos X de 250 kVp o de radiación γ de ^{60}Co . Los datos y análisis correspondientes a esta última ya se publicaron con anterioridad [3] y aquí solamente se incluye la curva calibrada, los valores de la ecuación correspondiente y el ejemplo en el que se aplica dicha curva.

Las constantes de la curva para radiación γ de ^{60}Co son:

$$c = 0.00074 \pm 0.0009$$

$$\alpha = 0.026 \pm 0.008$$

$$\beta = 0.053 \pm 0.004$$

$$X^2 = 8.29 \text{ con } 7 \text{ grados de libertad}$$

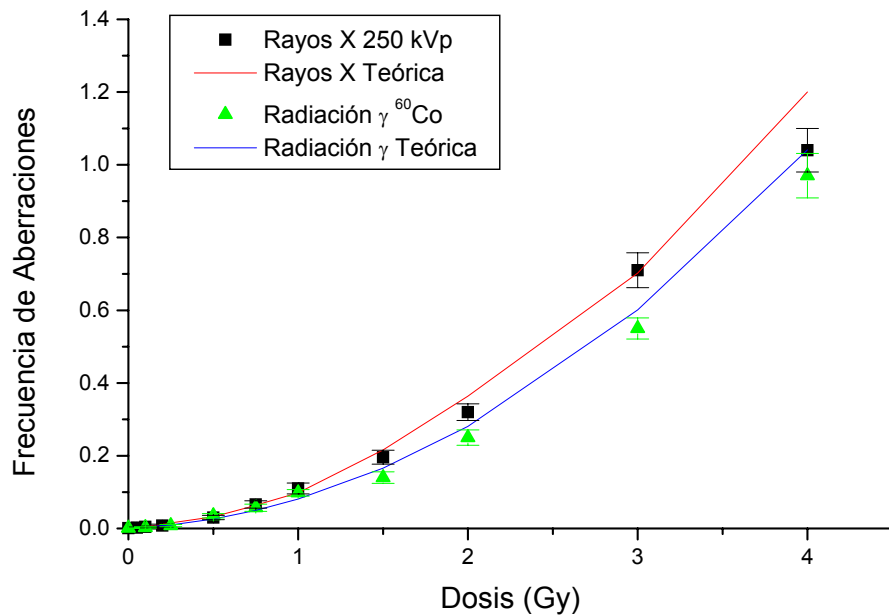


Figura 1. Curvas de dosis-respuesta para rayos X de 250 kVp y radiación γ de ^{60}Co .

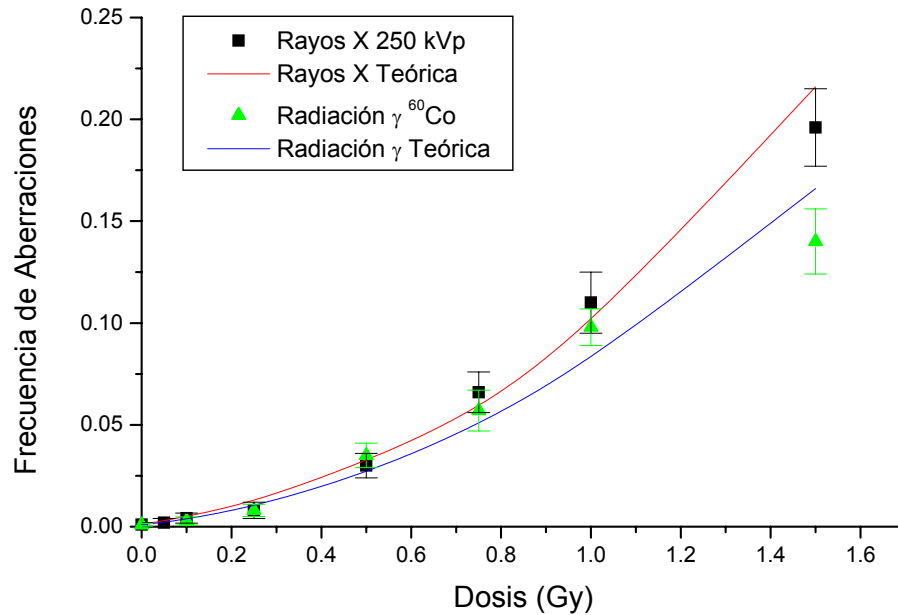


Figura 2. Detalle de las curvas de dosis-respuesta en el intervalo de 0 a 1.5 Gy.

La dosimetría biológica es complementaria a los sistemas tradicionales y solamente se practica en casos de exposición accidental o cuando el dosímetro convencional marca valores por encima de lo permitido. La dosis se calcula en función de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en los linfocitos del individuo en estudio y se toma como referencia a la curva de dosis-respuesta previamente generada *in vitro*, específica para cada tipo de radiación.

Como ejemplo se incluyen varios casos en los que se examina el número de aberraciones cromosómicas para confirmar o modificar las dosis de radiación γ inicialmente calculadas y establecer si en realidad hubo exposición excesiva, ya que los respectivos dosímetros individuales así lo sugerían. En la Tabla II se muestran los resultados del análisis citogenético y el estimado de dosis. Así en 7 de 9 casos, el estudio de los cromosomas fue decisivo para descartar lo registrado por el dosímetro que era superior a lo esperado para el trabajador. En los dos restantes, con niveles de exposición localizados dentro de la región poco sensible de la curva, se calculó la dosis más probable de acuerdo a la distribución de Poisson. En un caso la probabilidad se inclinó hacia lo registrado en el dosímetro físico, mientras que en el otro no, indicando así que en este último no se había rebasado el límite de exposición permitido [7 y 8].

Sustituyendo el valor de **Y** (frecuencia de aberraciones) en la ecuación para radiación γ (ecuación 2) con los valores de los coeficientes generados:

$$Y = 0.001 + 0.026D + 0.053D^2 \quad (2)$$

Los ejemplos de la Tabla II marcados con el rombo (\blacklozenge) son aquéllos en que el estimado de dosis biológica permitió descartar el valor originalmente registrado por el dosímetro TLD. Los casos 1A1 y 5A son particularmente representativos. El primero, en el que la dosis del TLD es de 0.443

Gy, se encontró una frecuencia de dicéntricos de 0.003, que difiere por mucho con el valor del dosímetro ya que si así fuera se esperaría una frecuencia de dicéntricos de 0.0229. Aún así dicha frecuencia es mayor a lo permitido para un POE (0.002), por lo que se utilizó la fórmula (ecuación 3) de Poisson para determinar cuál alternativa tenía más probabilidad de ser la correcta.

Tabla II. Estimación de dosis de los trabajadores presuntamente sobreexuestos según la ecuación del ININ [3].

Caso	Dosis TLD (Gy)*	Frecuencia dicéntricos	Dosis biológica ININ (Gy)
1Br♦	0.25	0.0019	0.032
1A1♦♠	0.443	0.0039	0.093
1A2	0.035	0.0019	0.032
2A1♦	0.144	0.0011	0.0038
2A2	0.044	0.002	0.0358
3A♦	0.607	0.002	0.0358
4A♦	0.054	0.0013	0.0113
5A♦♠	0.22	0.004	0.096
7A♦	0.08	0.0013	0.0113

*Estimado de dosis del dosímetro personal, convertido de mSv a Gy. ♦se descarta al dosímetro ♠se aplicó Poisson

$$F(x) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^x}{X!} \quad (3)$$

Donde:

λ = Número de dicéntricos calculados a partir de la ecuación (2)

X = Número de dicéntricos que provienen del análisis al microscopio

Si no había exposición, la frecuencia sería de 0.002 pero si la dosis en el dosímetro corresponde a 0.443 Gy, entonces dicha frecuencia aumentaría a 0.0229 (ecuación 2). Si se esperaba encontrar 2 dicéntricos en mil, la probabilidad de que hubiera 4dicéntricos, es 0.0155, mientras que la de encontrar 0.0229, es considerablemente menor, 2.478×10^{-9} . Este cálculo descarta por tanto, lo registrado por el dosímetro, es decir 0.443 Gy, y confirma que el estimado biológico es correcto al indicar una dosis de exposición de 0.093 Gy.

El segundo caso de análisis es 5A. La presunta exposición de este trabajador corresponde a radiación γ y su TLD indicó una dosis 0.22 Gy. Del análisis citogenético de 500 células se encontraron 2 dicéntricos por lo que la frecuencia de aberraciones es 0.004 ± 0.0028 .

Sustituyendo el valor de Y (frecuencia de dicéntricos) en la ecuación (2) con los valores de los coeficientes para radiación γ la dosis de exposición correspondería a 0.096 Gy.

El resultado se encuentra por debajo de lo registrado por el dosímetro TLD 0.22 Gy. De aquí surgen dos posibilidades que la dosis sea cero, porque el valor mínimo calculado con la ecuación

(2) es considerado como basal o bien que la dosis que marca el dosímetro sea la correcta. En este caso se puede utilizar la fórmula de probabilidades de Poisson (ecuación 3).

Si la dosis es cero, entonces la frecuencia debería de ser 0.5 dicéntrico en 500 células. Si la dosis es 0.22 Gy, entonces debería haber 4.64 dicéntricos en 500 células (ecuación 2). Si se esperaba encontrar 0.5 dicéntricos en 500 células, la probabilidad de encontrar 2 dicéntricos es 0.074, pero si se esperaban 4.64 dicéntricos en 500 células, la probabilidad es de 0.104. Estos datos tienden a favorecer lo registrado por el dosímetro, es decir 0.22Gy.

El estudio de aberraciones cromosómicas en las personas afectadas por el accidente de 1983 en Cd. Juárez, Chih, fue originalmente realizado en el laboratorio Nacional de Oak Ridge en EE.UU. [9]. Para propósitos de comparación se tomaron las frecuencias de aberraciones publicadas por la CNSNS [9] y se calcularon las dosis respectivas, utilizando la ecuación para radiación γ de ^{60}Co de este laboratorio. Si se comparan los datos de las columnas 4 y 5 de la Tabla III, se nota que la diferencia entre ambos estimados es mínima. Además si se toma en cuenta los valores mínimo y máximo que provienen del error estándar de la misma ecuación 2 se aprecia la coincidencia en los cálculos de dosis.

Tabla III. Comparación entre los estimados de dosis de Oak Ridge y del ININ, efectuados a las personas afectadas por la radiación en el accidente de Ciudad Juárez de 1983.

Caso	Frecuencia dicéntricos	Dosis calculada en Oak Ridge 1985 (Gy)	Dosis calculada en ININ 2004 (Gy)	Valor mínimo de Dosis	Valor máximo de Dosis
1	0.132	1.51	1.35	1.247	1.461
2	0.283	2.03	2.07	1.946	2.222
3	0.008	0.27	0.19	0.162	0.237
4	0.004	0.16	0.096	0.078	0.124
5	0.032	0.66	0.556	0.497	0.633
6	0.02	0.50	0.40	0.352	0.466
7	0.096	1.24	1.12	1.027	1.224
8	0.026	0.58	0.48	0.428	0.554
9	0.002	0.10	0.036	0.028	0.049
10	0.118	1.39	1.26	1.165	1.372

4. CONCLUSIONES

La correlación de ambas curvas con las ya publicadas es adecuada, lo cual confirma que pueden utilizarse en cualquier momento para interpretar cualquier caso de exposición que se presente ya que reúnen todos los requisitos. En cuanto a la curva que corresponde a rayos X de 250 kVp se aumentará el número de células analizadas en el intervalo de dosis por debajo de 1.0 Gy pero de todos modos es aceptable y está lista para ser utilizada. Cabe aclarar que a la fecha no se ha tenido ningún caso en el que se sospeche de exposición con rayos X.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue parcialmente financiado por la Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardias en el año 2003 [10], así como la curva para radiación γ de ^{60}Co en el año 2001.

A la Técnica Dora Luz Barrón Manrique por el apoyo brindado en el procesamiento de las muestras y en parte del análisis citogenético para la curva para radiación γ de ^{60}Co .

REFERENCIAS

1. IAEA. *Biological dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment*, Technical Reports Series. No. 260, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria (1986).
2. International Organization for Standardization, Draft International Standard ISO/DIS19238, Radiation Protection—Performance criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics, p. 21 (2003).
3. Guerrero CC y Breña VM, “Dosimetría biológica: Curva de calibración radiación gamma de ^{60}Co ”, *Congreso Nacional de la Sociedad Nuclear Mexicana y XVII Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Seguridad Radiológica*. Septiembre. Morelia Mich. México, Septiembre, (2000).
4. Guerrero CC y Breña VM, “Comparación de aberraciones cromosómicas producidas con distintas energías de rayos X”, *Congreso Nacional de la Sociedad Nuclear Mexicana y Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Seguridad Radiológica*, Ixtapa, Zihuatanejo, México, Noviembre (2002).
5. Guerrero CC, Edwards AA y Lloyd DC, “Chromosome aberration induction in human lymphocytes and its dependence on X-ray energy”, *Radiat. Protec. Dosim.* **106**, p. 131-135 (2003).
6. Guerrero CC y Breña VM, *Recomendaciones en relación al cultivo de linfocitos*, Informe Técnico Científico CB-019-99, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Salazar, Edo. de México, México (1999).
7. Guerrero CC y Breña VM, “Estimación de dosis biológica en personal ocupacionalmente expuesto”, *Congreso Nacional de la Sociedad Nuclear Mexicana y Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Seguridad Radiológica*, Zacatecas, Zac. México, Octubre, (2001).
8. Guerrero CC y Breña VM, “Análisis cromosómico y aplicación de la dosimetría biológica en dos casos de aparente sobreexposición”, *XII Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN*, Salazar, México, Diciembre (2002b).
9. *Accidente por contaminación con $^{60}\text{Cobalto}$, México 1984*. CNSNS-IT-001. Secretaría de Energía, Minas e Industria Paraestatal, México, D. F. (1985).