

DOSIMETRÍA CITOGÉNÉTICA CURVA DOSIS-RESPUESTA PARA BAJAS DOSIS DE RAYOS-X

Virginia E. Noval Lara¹, William R. Pineda Bolívar²
Cecilia Crane Uruña³, Víctor M. Pabón Riaño⁴

^{1,2,4} Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología Nuclear
Universidad Distrital “Francisco José de Caldas” (UD)
Carrera 4 N° 26 B 54 - Macarena B
Bogotá, D.C., Colombia
venovall.15@hotmail.com
wrpineda@misena.edu.co
ympabonr@udistrital.edu.co

³ Laboratorio de Genética
Instituto Nacional de Salud (INS)
Avenida calle 26 No 51-20 - Zona 6 CAN
Bogotá, D.C., Colombia
cecicrane@yahoo.com

CÓDIGO: 3221

RESUMEN

Se estudió el efecto biológico de la irradiación *in vitro* de muestras de sangre periférica con dosis de rayos-X_{4MV} bajas ($\leq 0,5$ Gy) de un acelerador lineal de electrones ELEKTA; en el cultivo de linfocitos se analizó la aparición de *dicéntricos*, pues las interacciones aleatorias de radiaciones de *baja LET* (rayos-X) con las células, producen efectos en el ADN que se evidencian como aberraciones cromosómicas. La irradiación se hizo según norma ISO 19238-2004 y TRS N° 405-2001 IAEA, en el Centro Oncológico Javeriano y el cultivo de linfocitos en el INS, mediante técnicas de citogenética humana establecidas en EEDDCARIO acorde con normas de “American Medical Genetics Association” y “European Clinical Citogenetics Association”. Se analizaron 6864 células en metafase y cuantificaron cromosomas dicéntricos en 1000 metafases en promedio por dosis de radiación. El análisis estadístico de la frecuencia de dicéntricos por célula, para comprobar que obedece a una función de Poisson, se efectuó con la prueba de *varianza relativa* (valores cercanos a 1) y *el índice de dispersión de Papworth* (valores entre $\pm 1,96$). La curva dosis-respuesta de rayos-X en el rango (0,0 - 0,5Gy) sigue un comportamiento lineal cuadrático, $Y_D = 0,0005(\pm 0,0005) + 0,0020(\pm 0,0126)D + 0,0840(\pm 0,0344)D^2$, se ajustó por el *método de máxima verosimilitud* con el programa CABAS, límites de confianza (0,95). Se pretende continuar su estandarización y validación, para utilizarla en el diagnóstico médico para determinar las dosis de exposición en trabajadores ocupacionalmente expuestos a rayos-X, pacientes y público en general.

1. INTRODUCCIÓN

En Colombia se emplean actualmente, con fines pacíficos, diversas fuentes de radiación ionizante, pero esas aplicaciones involucran la probabilidad de ocurrencia de accidentes, por su amplia utilización en diferentes sectores como la medicina, la industria, el agropecuario y la investigación. En medicina se emplean para diagnóstico, radioterapia y medicina nuclear; en la industria se usan fuentes radioactivas selladas para perfilaje de pozos petroleros, determinación de espesores, niveles de llenado, densidades y en ensayos no destructivos; en los sectores agropecuario y de investigación, se usan como radiotrazadores (moléculas marcadas). Por eso la exposición accidental a esta radiación crea en el País la necesidad de establecer métodos alternos y complementarios para evaluar la cantidad de dosis de radiación a la que se puede exponer una persona, como los de medir el daño causado por la radiación (frecuencia de aberraciones cromosómicas) en función de la dosis de exposición recibida.

Por tanto el objetivo de ésta investigación era realizar un estudio preliminar con miras a estandarizar en el futuro, la curva dosis-respuesta para bajas dosis de rayos-X, mediante el análisis de cultivos *in vitro* de muestras de sangre periférica de 3 hombres y 3 mujeres ocupacionalmente no expuestos a fuentes de radiación ionizante artificial, edad 18 – 40 años, en lo posible no fumadores.

La *dosimetría citogenética* se fundamenta en el análisis de lesiones letales o subletales producidas en el ADN por la radiación ionizante, cuya valoración se efectúa mediante la observación al microscopio de aberraciones en los cromosomas de linfocitos T de sangre periférica humana (dicéntricos, fragmentos acéntricos, rupturas, deleciones y otras anomalías). Los dicéntricos son por excelencia el biomarcador que más se emplea en esta dosimetría, ya que se forman específicamente con la radiación ionizante [1]. La formación de este tipo de anomalía se da una vez la radiación ocasiona rupturas en dos cromosomas sin replicar y genera extremos rotos en ambos; presentan una *frecuencia basal baja* (alrededor de un dicéntrico en 2000 células) y son fáciles de identificar una vez la célula está en metafase, tienen alta sensibilidad (umbral de dosis de 0,05 Gy), y se observan hasta dosis de 5 Gy.

La dosimetría citogenética actualmente es reconocida como un método valioso de evaluación de dosis que llena un vacío entre las técnicas dosimétricas, especialmente cuando hay dificultades de la interpretación de datos, en los casos en que hay motivos para creer que el personal ocupacionalmente expuesto (POE), por no portar los dosímetros, ha sido expuesto a radiación, en casos de reclamaciones de indemnización de daños por radiación, que no son apoyados por la evidencia inequívoca de los dosímetros personales, o en casos de sobreexposición de las personas durante su tiempo de vida laboral [2], y en especial, últimamente ha sido utilizada para la evaluación de dosis de radiación de personas expuestas en accidentes nucleares y radiológicos como los de Fukushima, 2011 (reactor) [3,4], Goiânia, 1987 (^{137}Cs), Chernobyl, 1986 (reactor), México, 1984 (^{60}Co) [5].

En 1962 Bender y Gooch sugirieron por primera vez que la producción de aberraciones cromosómicas radionducidas en linfocitos sanguíneos podría ser la base de un *dosímetro biológico*, a raíz de las dosis recibidas por tres personas expuestas de forma accidental en Handford, USA [5,6]; desde entonces se ha estandarizado como un complemento dosimétrico muy importante a la hora de un accidente o incidente radiológico. En conclusión, la dosimetría citogenética utiliza los indicadores de daños por radiación reconocidos a nivel mundial, como las *aberraciones cromosómicas* y los *micronúcleos*, ambos estudiados en los linfocitos de la sangre periférica. Para éste análisis se establecen las relaciones dosis-efecto (fenómeno individual) y dosis-respuesta (fenómeno poblacional) en ambos indicadores [6].

La *dosimetría biológica* es un término muy amplio, pues cuantifica de muchas maneras, los efectos biológicos de la radiación ionizante, y comprende la dosimetría clínica y la dosimetría citogenética (Fig.1); entre las instituciones especializadas a nivel mundial en el tema, además del OIEA, está el *AFRRI* (“*Armed Forces Radiobiology Research Institute*”) [7]. La *radiobiología* es la disciplina que estudia los fenómenos que suceden una vez que un tejido vivo ha absorbido la energía depositada por las radiaciones ionizantes, esto es, las lesiones que se producen y los mecanismos que tiene el organismo para reparar dichas lesiones [8].

Mediante la *dosimetría clínica*, se puede calcular de manera individualizada, la dosis de radiación recibida por los POE y pacientes, a través de registros semanales, mensuales o anuales, que indiquen una sobreexposición y además evidencien síntomas característicos del síndrome agudo de radiación, SAR.

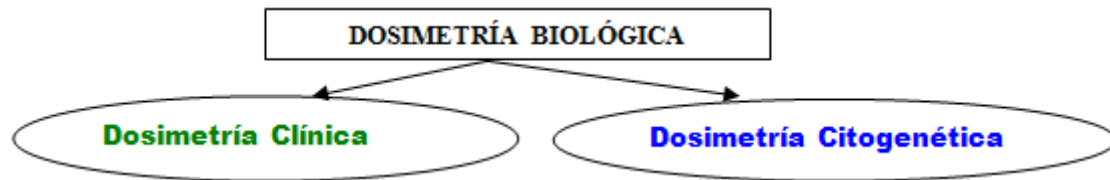


Figura 1. Clasificación de la dosimetría biológica [6]

La formación de dicéntricos, al igual que los otros tipos de aberraciones, es proporcional a la dosis de radiación que recibieron las muestras de sangre, por tanto la elaboración de la curva calibrada, para estimar la dosis individual se basa en el supuesto que la relación entre el daño cromosómico (Y) y la dosis (D) se describe mediante la ecuación lineal-cuadrática [6,9,10]:

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

donde,

$Y =$ frecuencia de dicéntricos/célula

$D =$ dosis de radiación

$C =$ control de frecuencia basal de dicéntricos

$\alpha, \beta =$ coeficientes lineal y cuadrático, respectivamente

Lo anterior supone, acorde con la Teoría Clásica de Sax [10], que para formar un cromosoma dicéntrico, se necesitan mínimo dos roturas (lesiones) en dos cromosomas, es decir en ambas cromátidas y que haya intercambio entre ambos. Las dos roturas se pueden producir en una o en dos trayectorias de radiación, como se aprecia en la fig. 2; en el primer caso, el número de dicéntricos que se producen será proporcional a la dosis (factor lineal αD). El número de dicéntricos producido por dos trayectorias, lo representa el factor cuadrático (βD^2) [5,6,9,10]. Para radiaciones de baja LET (“Linear Energy Transfer”), al aumentar la tasa de dosis, el factor βD^2 se hace importante, en cambio con las de alta LET, predomina el componente lineal αD y el coeficiente β tiende a cero. Por tanto para este tipo de radiación, la relación entre la dosis y la frecuencia de dicéntricos es una función lineal.

La elaboración de una *curva dosis-respuesta* en el propio laboratorio, es el principal requisito para estimar la dosis que recibió un trabajador ocupacionalmente expuesto, el personal médico o el público en general. Todas las radiaciones ionizantes inducen los mismos tipos de alteraciones cromosómicas, no obstante, la frecuencia de cada tipo de alteración y su distribución por célula depende de la dosis, la tasa de dosis, y de la LET de la radiación. La producción de dicéntricos por rayos-X y radiación γ ($W_R = 1$), obedecen a una distribución de Poisson, mientras que radiaciones con alta LET, como neutrones, partículas α , protones, etc., obedecen a distribuciones en donde la varianza supera la media.

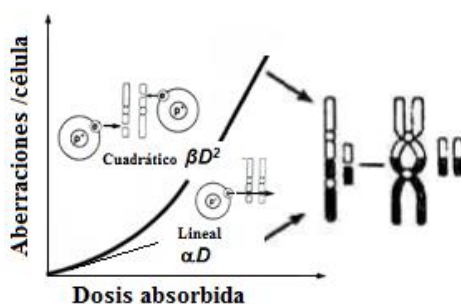


Figura 2. Formación de aberraciones cromosómicas inducidas por: una trayectoria, αD ; dos trayectorias, βD^2 [5,11]

La técnica recomendada para la determinación de un mejor ajuste de los coeficientes es el *método de estimación de máxima verosimilitud* que se debe hacer mediante la maximización de la probabilidad de las observaciones, asumiendo una distribución de Poisson y utilizando el método de ponderación iterativa de mínimos cuadrados.

La dosimetría citogenética trae los siguientes *beneficios* [6]: **a.** Si la dosimetría física indica sobreexposiciones que han ocurrido en circunstancias bien definidas, mediante la citogenética se pueden comparar los valores obtenidos, para realizar un diagnóstico rápido y fácil. **b.** Cuando la irradiación no es uniforme, la dosimetría citogenética permite aproximaciones a la dosis recibida en el cuerpo. **c.** La dosimetría citogenética, permite a la persona no ocupacionalmente expuesta, en caso de un accidente o incidente radiológico, evaluar cuanta dosis recibió. **d.** La exposición a la radiación, que no necesariamente puede obedecer a accidentes, también involucra al POE, pacientes y público en general, por tanto la dosimetría citogenética, forma parte importante de la *vigilancia epidemiológica* de la población.

Las *condiciones* apropiadas para realizar un estudio de dosimetría citogenética, son [1,12]: **a.** Garantizar la uniformidad en la irradiación de los tubos que contienen las muestras de sangre. **b.** Garantizar un equilibrio apropiado de partículas cargadas (equilibrio electrónico), el cual se logra rodeando las muestras con un material de composición similar a la sangre o al agua. **c.** La tasa de dosis para una exposición aguda *in vitro* debe ser elegida de tal manera, que todas las dosis que vayan a ser suministradas se hagan en un tiempo no superior a 15 minutos. **d.** Los materiales y la geometría de éstos, que van alrededor de la cámara de ionización, se deben seleccionar de tal manera que las correcciones por la distancia, la absorción y la dispersión de la radiación, se reduzcan al mínimo, utilizando materiales de composición química similar a la sangre. **e.** Cuando se presenta un supuesto caso de sobreexposición, la muestra de sangre se debe obtener entre las 6 horas y el primer mes del accidente.

Las *recomendaciones* [6,13] a tener en cuenta en la técnica de cultivo de linfocitos, para el estudio de dosimetría citogenética, con el fin de obtener un buen rendimiento de metafases, son: **a.** La muestra de sangre se debe tomar mediante el sistema Vacuntainer Becton Dickinson, en tubos que contengan algún tipo de anticoagulante, como heparina de litio o de sodio (Líquimine); no se recomienda la utilización del ácido etilendiaminotetracético, EDTA

pues contribuye a un bajo crecimiento celular. **b.** La muestra no se debe irradiar, ni sembrar después de 24 horas de la toma y se debe refrigerar a 5°C hasta el momento de la siembra. **c.** Usar medios de crecimiento lento, como el medio esencial mínimo MEM, por su pH óptimo (7,0-7,2) y alto contenido de ácido fólico que favorece la división celular; el TC 199 tiene bajo contenido de ácido fólico y un pH alcalino que ayuda a que se exprese mejor el sitio frágil del cromosoma X, sin embargo, hay otros cultivos que promueven un crecimiento celular más rápido, como el RPMI 1640, que es más enriquecido y sirve también para cultivos de tejido como muestras coriónicas. **d.** Al medio de cultivo se debe adicionar suero fetal bovino (SFB) inactivado o humano tipo AB, en una proporción del 10 al 20%, para proporcionar más enriquecimiento. **e.** Por lo general la proliferación de los linfocitos se induce con la fitohemaglutinina (PHA), que provoca la estimulación de los linfocitos T, por un mecanismo de unión a la membrana celular, que altera la permeabilidad y ocasiona la entrada de iones Ca^{2+} , por lo que después de una hora, la estimulación es irreversible, de manera que aunque se elimine esta sustancia del medio de cultivo, se produce la síntesis de ADN y la división de los linfocitos. De igual forma existen otros tipos de mitógenos como la concanavalina A, proteína de *Canavalia ensiformis*, derivados de *Phytolacca americana*, pero se recomienda más la primera. **f.** Mantener los cultivos a $37 \pm 0,5^\circ C$ durante 48 horas, pero no superar 72 horas según normas cada laboratorio; la temperatura se debe mantener constante, pues si fluctúa, el índice mitótico es muy bajo y afecta en ocasiones los análisis estadísticos. Se recomienda mantener en la incubadora una atmosfera de CO_2 al 5% para incrementar la acidez del cultivo. **g.** El estado de metafase del ciclo celular se ve interrumpido por algunos agentes antimitóticos como la *colchicina* al 0,016%, este es un alcaloide soluble en agua que se extrae de la semilla del azafrán. La colchicina se une a la tubulina e inhibe la formación del huso acromático por despolimerización de sus fibras, e impide su posterior polimerización, inhibiendo así el ciclo celular. Una vez agregada se debe incubar nuevamente a $37^\circ C$ por 15 minutos exactos. Durante la cosecha también se debe adicionar una solución hipotónica de KCl 0,075M a $37^\circ C$ durante 10 minutos, pues es la sal que produce menos daño a la estructura cromosómica. Esta solución hipotónica (concentración de Na menor que la intracelular) ocasiona un arrastre de agua a través de la membrana celular hacia el citoplasma, entonces la célula se hincha y los cromosomas se dispersan. **h.** Si el análisis citogenético se lleva a cabo en un microscopio óptico, inicialmente se debe buscar la metafase con el menor aumento posible 10X, y en el tiempo que se evidencie una metafase apropiada (fig. 3), se debe agregar aceite de inmersión y pasar a 1000X; por último se anota la coordenada y lo observado en un formato para tal fin.

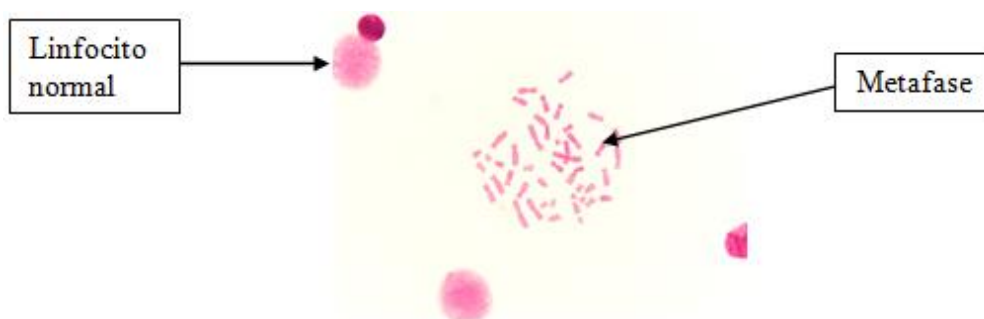


Figura 3. Linfocitos con tinción homogénea y en estadio metafásico
Foto tomada en Laboratorio de Genética, INS [6]

Existen programas automáticos que contabilizan el número de dicentricos en las metafases analizadas; en estudios recientes se ha mejorado la metodología del conteo rutinario, con la utilización de software de conteo automático, y al comparar, por ejemplo, si se hace un conteo de 50 metafases por parte de un experimentador, se encuentran alrededor del 50% de errores estadísticos, que si se analizan con un software automático, el error es de 4,3%, permitiendo la observación un mayor número de células; por ende el último método es mucho más preciso que el convencional y más rápido para el análisis [6].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de donantes para el estudio

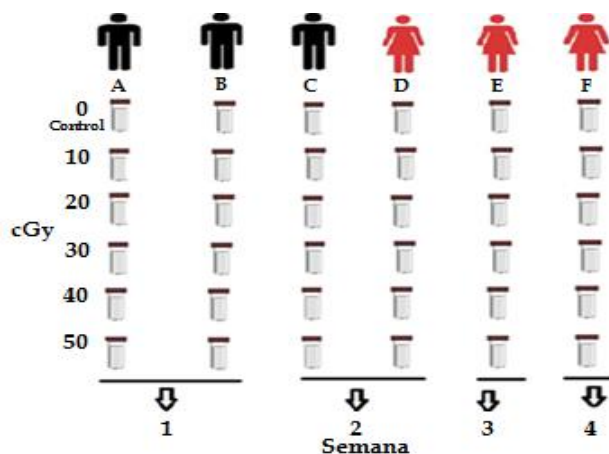
El estudio se hizo con 6 personas saludables (3 hombres y 3 mujeres), no expuestas a fuentes de radiación ionizante artificiales, ni a riesgos por agentes químicos o biológicos, entre 18 – 40 años, no fumadores, sin presencia de alteraciones físicas relevantes o anomalías congénitas, sin antecedentes de más de tres meses antes de realizarse un procedimiento de diagnóstico con rayos-X, no alcohólicos, sin consumo de alucinógenos y agentes antineoplásicos [6].

2.2. Toma de las muestras de sangre periférica

Las muestras se obtuvieron por punción en la vena; se extrajeron 18 mL de sangre a cada donante que se dividieron en 6 tubos Corning previamente etiquetados para tener un mínimo de 3 mL por cada punto de la curva incluyendo el blanco sin irradiar (Fig.4). Se utilizaron tubos con Líquemine, tapón de caucho y al vacío (sistema Vacutainer de Becton Dickinson).

2.3. Irradiación *in vitro* de muestras de sangre periférica

Las muestras se irradiaron con el acelerador lineal ELEKTA modelo SLi 18 MLC (Área Física Médica, Centro Javeriano de Oncología, Hospital Universitario San Ignacio), *simulador físico de agua sólida* (poliestireno 40x40x10cm), densidad electrónica igual a la del agua ($3,34 \times 10^{23} \text{ e/cm}^3$). El haz se calibró para que una *unidad monitor* (UM) corresponda a 1 cGy en agua, en un punto ubicado sobre el eje del haz, a la profundidad de máxima ionización en el isocentro y un campo de 10x10 cm. Posteriormente se calcularon las UM necesarias para administrar las dosis de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 Gy a las muestras. *Condiciones de irradiación:* la distancia del foco a la superficie del simulador fue de 95 cm, la muestra de sangre se colocó a una profundidad de 5 cm dentro del simulador de tal manera que coincidiera con el isocentro (100 cm del foco), el campo de irradiación fue de 12 x12 cm, para garantizar que los tubos estuviesen cubiertos por la zona plana del perfil del campo de irradiación. Se ubicaron los tubos en el centro del simulador físico para garantizar un completo equilibrio electrónico. Debajo del simulador se colocó una placa del mismo material para disminuir la retrodispersión. Se irradiaron las muestras de sangre con un haz de fotones de rayos-X_{4 MV} en un tiempo determinado menor a 15 s (Tab.1) [6]. La tasa de dosis indicada en la consola del acelerador, para un haz de 4 MV fue de 0,25 Gy/min. Las dosis se garantizan con una incertidumbre de $\pm 3\%$.



**Figura 4. Diseño para irradiación muestras sangre [6]
6 tubos: un control y cinco para diferentes dosis, cGy**

Tabla 1. Valores de dosis, UM y tiempo de exposición muestras/persona (0,25Gy/min)

Muestras Sangre	Dosis (Gy)	Dosis (UM)	Tiempo (s)
1 (blanco)	0,00	-	-
2	0,10	10,48	2,51
3	0,20	20,96	5,04
4	0,30	31,44	7,68
5	0,40	41,92	10,08
6	0,50	52,40	12,72

2.4. Cultivo de linfocitos

De cada muestra irradiada, se colocaron 0,8 mL de sangre en tubos de centrifuga, 4 mL del medio de cultivo MEM, enriquecido con 1 mL de suero fetal bovino al 20% y 0,1 mL de fitohemaglutinina P, para estimular la división celular. Todo se incubó 69 horas a 37°C. Luego se adicionaron 0,1mL de colchicina 0,016% para interrumpir la división celular en metafase y después de 20 minutos a 37°C, se centrifugaron a 1200 rpm (10 minutos), se eliminó el sobrenadante. Las metafases se aíslan por tratamiento hipotónico con KCl 0,075 M durante 4 minutos a 37°C, y a continuación se hacen 3 lavados con solución fijadora Carnoy (metanol: ácido acético) 3:1, 1:1 y 6:1 respectivamente, hasta obtener el botón celular; centrifugándose las muestras en cada uno de los pasos anteriores a 1200 rpm. Para el goteo en láminas se dispensó de 6 a 8 gotas del sedimento celular y se pasaron por un mechero para eliminar la humedad. La metodología detallada se encuentra en [6].

2.5. Coloración de láminas por el método Giemsa

La tinción de los cromosomas se hizo con una solución de Giemsa al 5%, la cual se vertió sobre las láminas goteadas durante 5 min, se lavaron con agua de la llave, y se realizó el montaje para iniciar el análisis de las metafases en el microscopio [6].

2.6. Análisis de metafases

Primero se utilizó el objetivo del microscopio de bajo aumento para examinar las laminillas y localizar así las metafases adecuadas que deben tener 46 cromosomas bien separados. Luego se cambió al objetivo de mayor aumento para el análisis del daño cromosómico representado en aberraciones por dicéntricos y fragmentos acéntricos correspondientes. Las anomalías como rupturas de cromátidas y “gaps” de cromosomas se contabilizaron por separado. De cada muestra irradiada, se estudiaron en promedio 170 metafases y por cada dosis se hicieron 6 cultivos, es decir, que se leyeron un total de 1000 metafases por punto de dosis, para estar dentro del intervalo de confianza (0,95) según las normas [1,12]. Con la *muestra control* (sin irradiar), se hizo un cultivo por persona y se leyeron 300 metafases para un total de 1800, con el fin de establecer la *frecuencia basal de dicéntricos*. De todas las aberraciones encontradas, solo los dicéntricos se utilizaron para elaborar la curva dosis-respuesta [6].

2.7. Análisis estadístico de los datos

Se realizó un análisis estadístico de la *distribución de dicéntricos por célula*, para lo cual se plantearon dos hipótesis: H_0 (la distribución de dicéntricos por célula obedece a una función de Poisson) y H_A (la distribución poblacional no obedece a una distribución de Poisson), que se comprobaron a través de las *pruebas de bondad del ajuste* (varianza relativa, VR e índice de dispersión de Papworth, U). Después de comprobar la distribución, se procedió al ajuste de la curva, que corresponde a una ecuación lineal-cuadrática $Y = C + \alpha D + \beta D^2$, con el programa CABAS (*Chromosomal Aberration Calculation Software*) [6, 14-16], y se obtuvieron los respectivos coeficientes C, α , β ; finalmente se calcularon los límites de confianza (0,95). Un documento útil sobre el tema es el de Szłuińska, M. et al. [16].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al iniciar la investigación y antes de irradiar, a todas las muestras de los donantes se les hicieron los *análisis clínicos* (virología, parasitología, microbiología) con el fin de establecer el buen estado de salud, normalidad cromosómica y descartar el posible riesgo biológico para la manipulación de las muestras. Los resultados clínicos indicaron buenas condiciones de bioseguridad para su manejo, además en las muestras sin irradiar se halló normalidad cromosómica en todos los donantes al hacer el *análisis citogenético* (por cariotipo de alta resolución, bandeado G y R); se aclara que estos resultados no se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico, solo como parámetro de calidad para la selección de los donantes.

3. 1. Análisis citogenético de muestras irradiadas

Se analizaron 6864 metafases entre muestras control (0 Gy) e irradiadas con rayos-X (0,1- 0,5 Gy). En la Fig.5 se muestran algunos tipos de aberraciones cromosómicas observadas.

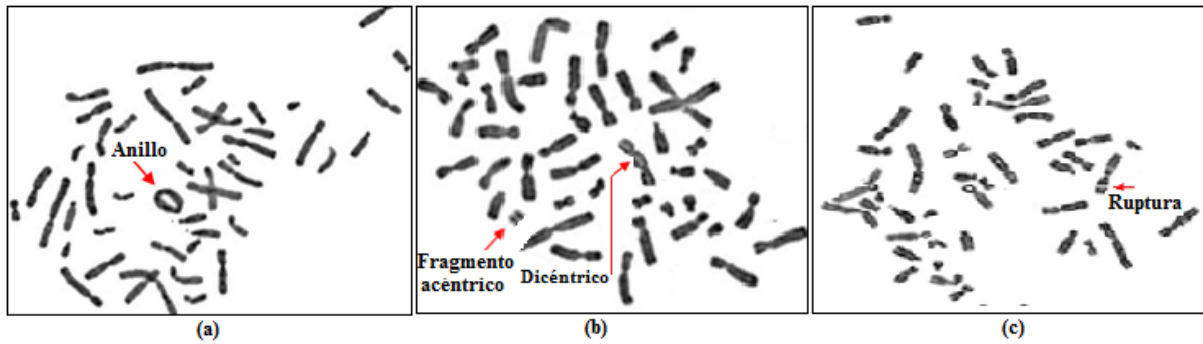


Figura 5. Metafasas en tercera división mitótica con:
(a) Un cromosoma en anillo 0,3 Gy; (b) un cromosoma dicéntrico y su acéntrico 0,4 Gy
(c) una ruptura cromosómica 0,5 Gy

En la tabla 2 se presentan las aberraciones encontradas en linfocitos, al igual que el número de células analizadas por dosis. De estas, los cromosomas dicéntricos son el mejor indicador de la dosis recibida, pues presentan una frecuencia basal baja y son de fácil identificación. Los cromosomas en anillo, también son fáciles de identificar y presentan frecuencia basal muy baja, pero poco se utilizan como marcador citogenético en estudios dosimétricos, porque inducen a una frecuencia inferior, comparados con los dicéntricos.

Tabla 2. Análisis citogenético de linfocitos irradiados con rayos-X

Dosis (Gy)	Células analizadas (N)	Dicéntricos (Dic)	Anillos (Ani)	Fragmentos acéntricos (Ace)	*Espacios (Gaps)	**Rupturas (Rup)	Aberración numérica (AN)
0,0	1800	1	0	4	5	1	2
0,1	1034	1	1	2	2	3	0
0,2	1005	3	1	3	3	1	0
0,3	1000	13	2	4	2	5	1
0,4	1018	16	4	6	8	8	0
0,5	1008	19	3	9	11	4	1

*,** Se incluyen en el conteo cromosómicos y cromatídicos

Los fragmentos acéntricos son indicadores de dosis aún más inciertos, pues su frecuencia basal es mayor debido a efectos confusos de otros mutágenos no radiológicos [6]. Por estas razones, solo los dicéntricos se utilizaron para la elaboración de la curva dosis-respuesta.

3.2. Pruebas estadísticas para evaluar la distribución de dicéntricos

La tabla 3, contiene los dicéntricos hallados, es decir su *distribución por célula* (y_c), al igual que la *media muestral* (μ) y la *varianza* (σ^2) [5,6].

Tabla 3. Frecuencias observadas de dicéntricos por célula para varias dosis de rayos-X

Frecuencia dicéntricos por célula y_c	Células Observadas, $C_{(Exp)}$					
	Dosis, Gy					
	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Células con:						
0 dic	1799	1033	1002	987	1002	989
1 dic	1	1	3	13	15	17
2 dic	0	0	0	0	1	2
3 dic	0	0	0	0	0	0
Total dic	1	1	3	13	16	19
Total células analizadas, N	1800	1034	1005	1000	1018	1008
μ	5×10^{-4}	9×10^{-4}	3×10^{-4}	$1,3 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-2}$
σ^2	$4,9 \times 10^{-4}$	$9,6 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-2}$

Para estimar la varianza, se calculó la probabilidad de formación de dicéntricos en las células, $P_{(Dic)}$. En la tabla 4 se presentan las probabilidades para dosis de 0,4 Gy; como se ve, para esta dosis (y para todas las estudiadas), la mayor probabilidad es 1 y la menor 0, y es más probable encontrar un dicéntrico por célula que hallar dos o más dicéntricos; por otro lado, no se puede decir a qué dosis se presenta un daño cromosómico característico, ya que aquí los efectos son al azar (*efectos estocásticos o probabilísticos*), pero sí se puede decir que no hay dosis por pequeña que sea a la que no se le asocie un efecto biológico.

Tabla 4. Probabilidad aparición dicéntricos con 0,4 Gy rayos-X

Número dicéntricos por célula y_c	Probabilidad $P_{(dic)}$	Frecuencia Teórica $C_{(teo)}$	Frecuencia Observada $C_{(Exp)}$
0	0,98	99×10^1	1002
1	$1,64 \times 10^{-1}$	$1,67 \times 10^1$	15
2	$1,37 \times 10^{-4}$	$1,39 \times 10^1$	1
3	$7,65 \times 10^{-7}$	$7,78 \times 10^{-4}$	0

Como se observa en la figura 6, la probabilidad de encontrar cero dicéntricos por célula, no varía significativamente en el rango de dosis utilizado, pues $P_{(Dic)}$ se aproximan a 1, es decir hay alta probabilidad de encontrar células sin daño cromosómico por los rayos-X.

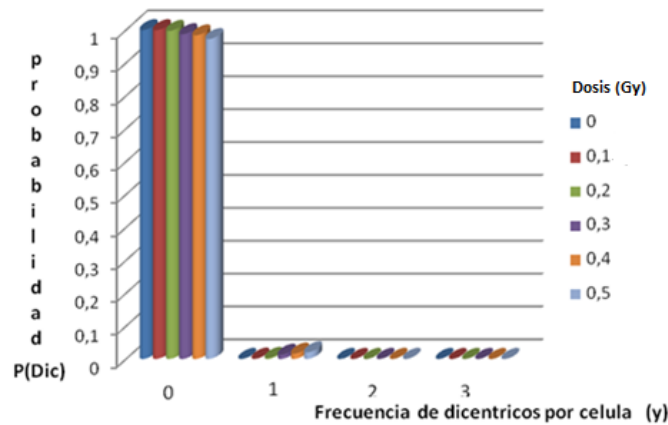


Figura 6. Probabilidad en función de la frecuencia de dicéntricos por célula

En la tabla 5 se resume el análisis estadístico, según el cual el valor VR se aproxima a 1 en todas las dosis evaluadas, lo que es característico de una *distribución de Poisson*, es decir que la media es igual a la varianza ($\sigma^2 = \mu \sim Y_D$), y con la prueba U , se busca asumir que los datos también obedecen a esta distribución, si los valores están en el intervalo $\pm 1,96$. Para el estudio, los valores varían desde $-0,99$ hasta $2,32$; solo para la dosis de $0,5$ Gy se sale del rango, debido a una posible sobredispersión causada por la presencia de 9 acéntricos extra a esa dosis (tabla 2) [10]; entonces se confirma la hipótesis (H_0) para una distribución de Poisson.

Tabla 5. Distribución intercelular de dicéntricos y pruebas de bondad de ajuste

Dosis	Total Células	Total	Distrib. Dic/células				σ^2	Y_D	VR	Prueba de Papworth
			Células con							
Gy	N	Dic	0 dic	1dic	2dic	3di			σ^2 / Y_D	U
0,0	1800	1	1799	1	0	0	$4,9 \times 10^{-4}$	0,0005	0,99	-0,99
0,1	1034	1	1033	1	0	0	$9,6 \times 10^{-4}$	0,0009	0,99	$-8,8 \times 10^{-4}$
0,2	1005	3	1002	3	0	0	3×10^{-4}	0,0029	0,99	$-2,24 \times 10^{-3}$
0,3	1000	13	987	13	0	0	$1,3 \times 10^{-2}$	0,0130	0,99	$-6,87 \times 10^{-2}$
0,4	1017	16	1002	15	1	0	$1,6 \times 10^{-2}$	0,0157	1,06	1,42
0,5	1008	19	989	17	2	0	$2,1 \times 10^{-2}$	0,0188	1,10	2,32

3.3. Ajuste de la curva dosis-respuesta (curva de calibración)

Para construir la curva de calibración, las frecuencias de dicéntricos observados (Y_D), se deben ajustar con programas de cálculo. El objetivo del ajuste de la curva es determinar, qué coeficientes α y β se ajustan mejor a las frecuencias observadas. Las frecuencias Y_D se ajustaron con el programa CABAS [14-16], que efectúa los cálculos mediante el *método de máxima verosimilitud*, y reporta los coeficientes con su desviación estándar, al igual que la bondad del ajuste (Chi-cuadrado χ^2 , grados de libertad (n-1), y nivel de significancia, ns):

$$C = 0,0005 (\pm 0,0005); \alpha = 0,0020 (\pm 0,0126); \beta = 0,0840 (\pm 0,0344)$$
$$\chi^2 = 3,4621; (n-1) = 3; ns = (5\%): 7,8147$$

Con χ^2 se establece si existe un buen ajuste entre los valores (Y_D) observados y la curva. Al comparar el valor χ^2 obtenido (3,4621) con el de una probabilidad del 95% y 3 grados de libertad (7,8147), por ser este valor superior al obtenido en el ajuste, los resultados indican un buen ajuste en cuanto al cálculo de los respectivos coeficientes C, α , β , es decir entre los valores observados y los obtenidos tras el ajuste. Con los coeficientes encontrados, la ecuación que resulta es de tipo lineal-cuadrático:

$$Y_D = 0,0005 (\pm 0,0005) + 0,0020 (\pm 0,0126)D + 0,0840 (\pm 0,0344)D^2 \quad (2)$$

Así se estableció la curva dosis-respuesta para rayos-X, con las dosis estudiadas (Fig. 7).

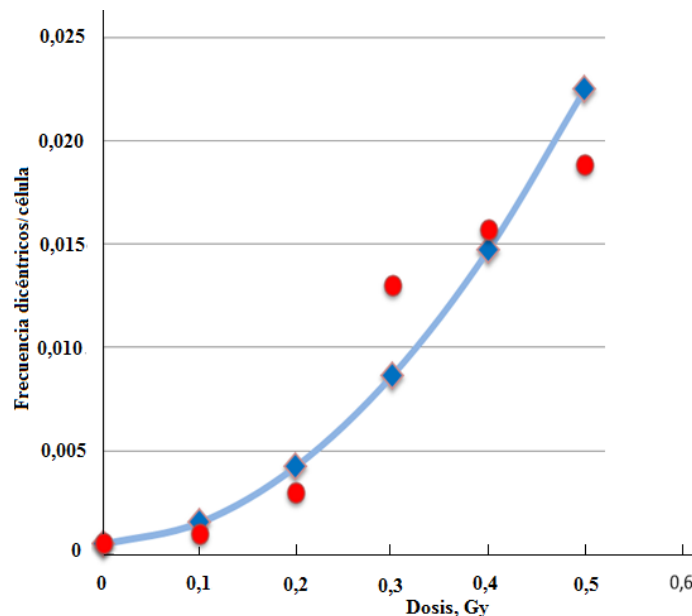


Figura 7. Curva dosis-respuesta para rayos-X;
Experimental (●); ajustadas (◆)

En este caso el factor lineal αD , está relacionado con el número dicéntricos Y_D , producidos por *un solo haz* de fotones X y su *frecuencia es proporcional* a la *dosis*, y el coeficiente es independiente de la tasa de dosis; por el contrario el componente cuadrático βD^2 , hace relación al número de dicéntricos Y_D producidos por *dos haces* o trayectorias independientes de radiación-X y los dicéntricos que se producen tienen una *frecuencia proporcional al cuadrado* de la *dosis*; esta magnitud se hace importante cuando se trabaja con altas tasas de dosis como en este caso, que la tasa de dosis del acelerador lineal fue de 0,25 Gy/min, con el fin de suministrar a las muestras de sangre las dosis requeridas, en el menor tiempo para evitar su descomposición, acorde con las normas (tabla 1).

El modelo lineal cuadrático tiene como propiedad que el valor del cociente α/β , es la dosis a la cual la contribución en la formación de dicéntricos por un haz (trayectoria) o por dos haces de fotones X, es igual. Dicho valor corresponde a 0,02381 Gy; por debajo de esta dosis, es probable que todas las aberraciones cromosómicas se generen por una única trayectoria de fotones X [5,10].

También se establecieron los límites de confianza (0,95) y a pesar que los valores de los coeficientes α y β hallados en esta investigación están muy cerca de los de la literatura para condiciones casi semejantes de rayos-X (*Investigación actual*, 0,25 Gy/min: $\alpha = 0,0020 \pm 0,0126$; $\beta = 0,084 \pm 0,034$. *Literatura*, Lloyd, D. C., Edwards, A. A., et al. [6, 19], 0,043 Gy/min: $\alpha = 0,0046 \pm 0,005$; $\beta = 0,065 \pm 0,003$), es prematuro considerar que la curva está terminada, hasta no estudiar más puntos de la curva con otras dosis en ese mismo rango, y completar mínimo 10 puntos, para establecer si el valor de los coeficientes varían.

4. CONCLUSIONES

Como se puede deducir de la tabla tres, en el número total de células analizadas (N), por norma más de mil, tanto para el control como para las tratadas con las dosis de rayos-X de 0,1-0,5 Gy, los daños o aberraciones (dicéntricos) se presentan con frecuencia (y_c) muy baja (de 1) y en muy pocas células; sin embargo las células que sufren daño, aumentan a medida que aumenta la dosis de radiación (1, 3, 13, 15 y 17 células), lo que indica que en el total de células irradiadas, el daño es muy bajo, conclusión que se complementa con la figura 6. La frecuencia de 2 dicéntricos solo se observa en 1 célula (0,4 Gy) y en 2 células (0,5 Gy). En las células del control (0 Gy), se observó lesión en una sola célula de las 1800 analizadas, debido probablemente a factores distintos a la radiación.

Esta investigación es continuación de la que se realizó en Colombia en el rango de (0,5-5Gy) con rayos-X y gamma [18], en este caso con dosis por debajo de 0,5 Gy de rayos-X. Se estableció una curva dosis-respuesta, solamente con 5 puntos, para tratar de comprobar, si a dosis bajas también se observa un comportamiento lineal cuadrático, el cual se cumple, pero es necesario completar la curva con más puntos y hacer la validación del método para determinar las dosis de exposición en trabajadores ocupacionalmente expuestos a rayos-X, pacientes y público en general, como complemento de la dosimetría física y contribución al diagnóstico médico ante un posible accidente o incidente radiológico.

AGRADECIMIENTOS

Al médico, Dr. Antonio José Bermúdez Fernández del INS por permitir la realización de la investigación en el Laboratorio de Genética y por su colaboración. A la Dra en física, Esperanza Castellanos del Centro Oncológico Javeriano, por su colaboración con las irradiaciones en el acelerador lineal.

REFERENCIAS

1. “International Atomic Energy Agency. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment-A Manual, TRS 405, IAEA, Vienna Austria”
http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/TRS405_scr.pdf (2001).
2. “International Atomic Energy Agency, Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies, IAEA, Vienna Austria”
http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/EPR-Biodosimetry%202011_web.pdf (2011).
3. “J. K. Lee, E. A. Han, S. S. Lee, W. H. Ha, J. F. Barquinero, H. R. Lee, and M. S. Cho, Cytogenetic Biodosimetry for Fukushima Travelers After the Nuclear Power Plant Accident: no Evidence of Enhanced Yield of Dicentric, J Radiat Res., **53**(6), pp.876–881,” <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3483860/> (2012).
4. “E. Gotoh, Cytogenetic Biodosimetry for Accidental Emergency Irradiation Exposure Preparedness, in Particular Merit of the Use of Drug-induced Premature Chromosome Condensation (PCC) with Calyculin A, Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol,” <http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/BiodosimetryID20114.html> (2012).
5. “M. A. Da Silva, Dosimetria Biológica em Proteção Radiológica: Elaboração de Curvas Dose-Resposta para Co e Cs, IPEN, São Paulo, Brasil”
http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Marcia%20Augusta%20da%20Silva_M.pdf (1997).
6. V. E. Noval, W. R. Pineda, *Introducción a la estandarización de curva dosis-respuesta de aberraciones cromosómicas estructurales en linfocitos producidas por rayos-X.*- C. Crane, V. M. Pabón/directores, Tesis grado, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, Colombia (2010).
7. “Armed Forces Radiobiology Research Institute, Biological Dosimetry, Uniformed Services University of the Health Sciences,”
<http://www.usuhs.mil/afrrri/research/biodos.htm> (2005).
8. “L. Vivallo, L. Villanueva, S. Sanhueza, Efectos de las radiaciones ionizantes en el ser humano, Comisión Chilena de Energía Nuclear, Santiago Chile,”
http://oirs.cchen.cl/saber/PDF/efectos_biologicos_mayo2010.pdf (2010).
9. “C. Guerrero Carbajal, C. Arceo Maldonado, Dosimetría biológica, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, México,”
<http://www.inin.gob.mx/documentos/publicaciones/contridelinin/Cap%C3%ADtulo%207.pdf> (2010).
10. “A. Montoro, Evaluación citogenética del efecto radioprotector del extracto etanólico de propóleos, Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España,”
<http://dspace.upv.es/xmlui/bitstream/handle/10251/1908/tesisUPV2369.pdf?sequence=1> (2006).
11. E. J. Hall, *Radiobiology for the Radiologist*, J. B. Lippincott, Philadelphia, USA (2006)

12. International Standar Organization, ISO 19238:2004, Radiation Protection-Performance Criteria for Service Laboratories Performing Biological Dosimetry by Cytogenetics, ISO, Geneve, Switzerland (2003).
13. C. Guerrero Carbajal, M. Breña Valle, *Recomendaciones en relación al cultivo de linfocitos*, Informe Técnico Científico CB-019-99, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Salazar, Edo. de México, México (1999).
14. "CABAS- Chromosal Aberration Calculation Software," <http://www.ujk.edu.pl/ibiol/cabas/index.htm>
15. "CABAS- Chromosal Aberration Calculation Software," CABAS version 2.0," http://www.ujk.edu.pl/ibiol/cabas/description_cabas.htm
16. "J. Deperas, M. Deperas-Kaminska, C. Lindholm, H. Romm, L. Roy, R. Moss, J. Morand, A. Wojcik, A. Edwards, D. Lloyd, M. Szuiska," CABAS- a Freely Available PC Program for Fitting Calibration Curves in Chromosome Aberration Dosimetry," http://lit.jinr.ru/Reports/SC_report_06-07/pdfall/p140.pdf
17. "M. Szłuińska, A. A. Edwards, D.C. Lloyd, Statistical Methods for Biological Dosimetry, HPA-RPD-011, Health Protection Agency, Chilton, Didcot, Oxfordshire, UK," http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1194947335656 (2005).
18. C. Crane, H. Zamora, A. Bermúdez, H. Barrreto, C. Pardo, *Dosimetría citogenética, Nucleares*, 5(9-10), pp. 10-18 (1990).
19. "D. C. Lloyd, A. A. Edwards, A. Leonard, et al., Chromosomal Aberration in Human Lymphocytes Induced in Vitro by Very Low Doses of X-rays. *Int J Radiat Biol.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1347066>," (1992).