

DOSIMETRÍA CITOGENÉTICA PARA ALTAS DOSIS DE RADIACIÓN MEDIANTE CONDENSACIÓN PREMATURA DE CROMOSOMAS

Autoría principal: Ana Ilsa Lamadrid Boada¹

Otros autores: Ivonne Romero Aguilera, Jorge Ernesto González Mesa y Omar García Lima

Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones (CPHR). Carretera de la Cantera Victoria II, Km 2^½, Pedro Pi, Guanabacoa. Fax. 682-0573

¹ Autor de correspondencia. Correo electrónico ana@cphr.edu.cu

Ana Ilsa Lamadrid Boada (40%). Es la primera autora, de los 4 artículos que soportan el resultado. Trabajó en el diseño y la concepción del trabajo y ejecuto la mayoría de trabajo experimental realizado. Ejecutó tareas técnicas dentro de los proyectos asociados al resultado. Participó en la escritura del resultado, de los artículos científicos publicados y salidas de proyectos. Hizo las presentaciones de los resultados obtenidos en eventos científicos.

Ivonne Romero Aguilera (20%). Es la primera autora de uno de los artículos que soportan este resultado. Participó en el diseño y la concepción del trabajo. Realizó tareas técnicas asociadas al resultado. Participó en la escritura del resultado y de un artículo científico publicado así como también la escritura de los informes y salidas de proyectos. Hizo presentaciones de resultados en eventos científicos

Jorge Ernesto González Mesa (20%). Realizó tareas técnicas asociadas al resultado. Participó en la escritura del resultado y de los artículos científicos publicados.

Omar García Lima (20%). Propuso la realización del trabajo y dirigió los principales proyectos que dieron origen al resultado. Participó en el diseño y la concepción del trabajo. Realizó las coordinaciones iniciales con las diferentes contrapartes extranjeras donde se realizaría parte del trabajo experimental. Participó en la escritura de este resultado y de los artículos que lo acompañan. Actuó como experto en la nueva versión del manual del OIEA sobre dosimetría citogenética.

RESUMEN

Antecedentes:

La dosimetría citogenética es la principal herramienta biológica que se utiliza para realizar estimaciones de dosis en las personas expuestas a las radiaciones ionizantes en los accidentes radiológicos y nucleares. Se fundamenta en las curvas de calibración que se establecen *in vitro* entre las aberraciones cromosómicas en los linfocitos humanos y la dosis de radiación, lo que permite, al ocurrir un accidente tomar sangre de la persona irradiada, cuantificar las aberraciones al microscopio y con los cálculos matemáticos pertinentes establecer la dosis de radiación recibida por el accidentado.

Por la importancia de esta actividad para los planes de respuesta a emergencias que deben existir en cada país el Organismo Internacional de Energía Atómica ha actualizado en el 2011 su manual sobre dosimetría citogenética [1] para la elaboración del cual se solicitó la participación de unos veinte expertos internacionales, entre ellos un cubano.

En su variante tradicional la dosimetría citogenética analiza la frecuencia de cromosomas dicéntricos en metafases en el intervalo de hasta 5-8 Gy de radiación gamma. Para dosis superiores no había posibilidades técnicas de estimación de dosis, hasta el surgimiento a finales del siglo pasado de la técnica de condensación prematura de los cromosomas en su variante química, conocida como PCC por sus siglas en inglés [2]. Esta técnica probó su utilidad en la estimación de altas dosis en el accidente de criticidad de Tokaimura, Japón en 1999 [3] aunque tenía como **problema** que no había curvas de calibración disponibles en ese momento en ningún laboratorio del mundo. Por lo que nos planteamos como **objetivos de trabajo**: Obtener curvas de calibración para radiación gamma y neutrones con la técnica de PCC inducida químicamente, y demostrar experimentalmente que es posible a altas dosis cuantificar anillos y por lo tanto estimar dosis con la técnica de PCC inducida por fusión.

Resultados:

Cuba, ha realizado un conjunto de aportes significativos al desarrollo de la dosimetría citogenética para altas dosis que se sustentan en la técnica de PCC que son en síntesis los siguientes:

- 1) La obtención de la primera curva de calibración aparecida en la literatura internacional que establece la relación entre la dosis de radiación gamma y la frecuencia de anillos obtenidos por la técnica de PCC químico (PCC-Rch, por sus siglas en inglés) (Anexo 1).
- 2) Establecimiento de la primera y hasta el momento única curva de calibración publicada en la literatura internacional que establece la relación entre la dosis de neutrones y la frecuencia de PCC-Rch. (Anexo 2).

- 3) La obtención por primera vez de parámetros de referencia que permiten con la técnica de PCC-Rch la estimación de dosis y la fracción del cuerpo irradiada en personas expuestas parcialmente a altas dosis de irradiación gamma (Anexo 3).
- 4) El desarrollo de una escala para la clasificación rápida de personas expuestas a altas dosis de irradiación con neutrones utilizando el "índice PCC" (Anexo 2).
- 5) La demostración experimental de que es posible a altas dosis cuantificar anillos y por lo tanto estimar dosis con la técnica de PCC fusión, que es anterior a la PCC química y elimina la necesidad de cultivar los linfocitos, lo cual ofrece el método citogenético más expedito para la estimación de altas dosis en accidentes publicado hasta el momento (Anexo 4).

El resultado tiene asociadas cuatro publicaciones internacionales (Anexos 1, 2, 3 y 4) y una publicación nacional (Anexo 5). Los dictámenes del consejo científicos se muestran en el anexo 6. En el Anexo 7 se muestra la relación de los artículos donde han sido citados los trabajos de los primeros años (hasta el 2011) y la contribución de los autores a la generalización del resultado. Parte de este trabajo fue premiado como resultado de Organismo en la Agencia de Energía Nuclear y Tecnologías de Avanzada en el año 2011 (Anexo 8). Para la realización de este resultado se han ejecutado dos proyectos nacionales y cinco proyectos internacionales (Anexo 9). Los eventos en que se han presentado trabajos que forman parte del resultado se relacionan en el Anexo 10.

Conclusiones:

Los resultados obtenidos incrementan la capacidad de respuesta del país para responder a emergencias radiológicas nacionales o regionales.

COMUNICACIÓN CORTA

Antecedentes

El momento en que ocurrirá un accidente radiológico y su magnitud son impredecibles. Puede ser desde un incidente con una fuente radioactiva aislada, hasta un accidente masivo o un ataque terrorista con componentes radioactivos. A partir de ese momento se levanta la emergencia radiológica y cuando esto ocurre, es importante estimar las dosis absorbidas por las víctimas y mejor aún conocer su distribución en el cuerpo para planear apropiadamente el tratamiento médico [1]. En la mayoría de los accidentes, la dosimetría física de la dosis absorbida no es posible y aún en casos donde sí lo sea, es importante su confirmación por métodos biológicos.

Para realizar una estimación de dosis eficaz en dosimetría biológica, hay dos aspectos que no deben relegarse: disponer de curvas para un amplio rango de dosis y acelerar el tiempo de respuesta lo más posible. La velocidad con que se obtenga la estimación de la dosis puede decidir la garantía de supervivencia de las personas involucradas. Los resultados obtenidos con la dosimetría citogenética se emplean dentro de la variante multiparamétrica junto a otros indicadores

biológicos, en la toma de decisiones sobre el tratamiento médico necesario en cada individuo.

Un nuevo método surgió en los años 90, la condensación prematura de los cromosomas (PCC) por inducción química [2], que evita el problema de la pobre proliferación celular presente en el ensayo del dicéntrico que es el “ensayo de oro” de la dosimetría citogenética por su exactitud y precisión pero que no permite estimar dosis por encima de 5-8 Gy. Con el PCC es posible estimar dosis de hasta 20 Gy de radiación gamma como se demostró en este trabajo. La condensación prematura puede hacerse también mediante fusión con células en metafase, denominándose el método PCC fusión [4].

El problema a resolver y los objetivos del trabajo

El PCC químico incrementó sus ventajas cuando se combinó con el recuento de los cromosomas en anillo en lugar de dicéntricos, denominándose PCC ring (PCC-Rch) por su nombre en inglés, convirtiéndose en el instrumento ideal para la estimación de dosis que superen los 5-8 Gy. Cuando surgió esta técnica tenía como problema que no estaban elaboradas las curvas de calibración para su aplicación práctica y no se había evaluado su aplicabilidad en irradiaciones parciales. Por lo que se plantearon los siguientes **objetivos de trabajo**.

- Obtener curvas de calibración para radiación gamma y neutrónica con la técnica de PCC-Rch.
- Establecer los parámetros de referencia que permiten con la técnica de PCC-Rch la estimación de dosis y la fracción del cuerpo irradiada en personas expuestas parcialmente a altas dosis de irradiación gamma.
- El desarrollo de una escala para la clasificación rápida de personas expuestas a altas dosis de irradiación con neutrones utilizando el “índice PCC”.
- Demostrar experimentalmente que es posible a altas dosis cuantificar anillos y por lo tanto estimar dosis con la técnica de PCC fusión.

Resultados

1) La obtención de la primera curva de calibración aparecida en la literatura internacional que establece la relación entre la dosis de radiación gamma y la frecuencia de anillos obtenidos por la técnica de PCCRch.

Esta curva se realizó en el año 2005 en el Laboratorio de Dosimetría Biológica del IRSN por especialistas del CPHR y de la propia institución francesa. Fue esta la primera de las curvas elaboradas por nuestro equipo de trabajo debido a la prevalencia general de sobreexposiciones accidentales con fuentes de Co60, Cs137 o Rayos X. La metodología empleada aparece en el Anexo 1. Para construir esta curva se analizaron 5111 células PCC en estadios G1, G2 y M en el intervalo de dosis de 5 a 25 Gy de radiación gamma 60Co.

Las frecuencias (Y) de anillos observados mostraron una relación lineal con la dosis (D) representada por la ecuación $Y = c + \alpha D$, cuyos coeficientes fueron: $\alpha =$

$0,021 \pm 0,0007$ y $c = 0,0005 \pm 0,0005$. El mejor ajuste lineal obtenido concuerda con los modelos planteados para la formación de aberraciones cromosómicas para altas dosis y la frecuencia de anillos encontrada concuerda con la reportada por otros autores utilizando el mismo protocolo de cultivo pero inferior a la obtenida por otros autores, probablemente debido a diferencias en los criterios de conteo.

2) Establecimiento de la primera y hasta el momento única curva de calibración publicadas en la literatura internacional que establece la relación entre la dosis de neutrones y la frecuencia de PCC-Rch.

La obtención por primera vez empleando el método de PCC-R inducido químicamente de una curva dosis efecto para la estimación de exposición *in vitro* a la irradiación con neutrones se realizó en dos grupos de experimentos llevados a cabo por el mismo equipo de trabajo y con las mismas condiciones experimentales. La metodología detallada aparece en el Anexo 2. Para esta curva se analizaron 11 019 células PCC en estadios G1, G2 y M en el intervalo de dosis de 1-25 Gy de irradiación con neutrones de fisión.

El ajuste de las frecuencias de anillos observadas desde 0 a 3,8 Gy fue obtenido con el modelo lineal $Y = \alpha D$, como era de esperarse para radiaciones de alta transmisión lineal de energía (LET), con un coeficiente $\alpha = 0,059 \pm 0,003$. La curva puede utilizarse para casos de sobreexposiciones accidentales a neutrones, pudiendo obtenerse estimaciones precisas hasta 4 Gy, aproximadamente. El empleo de un amplio intervalo de dosis de radiación y la posibilidad de obtener células analizables en este intervalo permitió una caracterización más precisa de la respuesta a la dosis y el proceso de saturación.

3) La obtención por primera vez de parámetros de referencia que permiten con la técnica de PCC-Rch la estimación de dosis y la fracción del cuerpo irradiada en personas expuestas parcialmente a altas dosis de irradiación gamma.

El objetivo de este trabajo fue probar la capacidad potencial de utilizar el ensayo PCC-Rch para la estimación de exposiciones parciales utilizando el enfoque desarrollado por Dolphin [5] para el ensayo del dicéntrico ya que anteriormente otros autores no habían obtenido buenos resultados al aplicar este ensayo en irradiaciones parciales simuladas [6]. Considerando que el PCC-Rch es aplicable a las altas dosis, realizamos irradiaciones en el intervalo entre 5 y 20 Gy y simulamos exposiciones parciales entre el 10 y el 90%.

Se propuso un valor calculado de $D_0 = 10.9$ Gy para utilizarlo en el ensayo PCC-Rch, probamos que con este ensayo es posible la diferenciación entre irradiaciones totales y parciales, la estimación de la dosis en la parte del cuerpo irradiada y la estimación de la fracción de sangre inicialmente irradiada. Los resultados obtenidos en las estimaciones probaron la factibilidad de aplicar el

ensayo para la estimación de exposiciones parciales. Todos los detalles de este trabajo aparecen en el Anexo 3.

4) El desarrollo de una escala para la clasificación rápida de personas expuestas a altas dosis de irradiación con neutrones utilizando el “índice PCC”.

El “índice PCC” permitió discriminar con facilidad 3 grupos de dosis: de 0–1 Gy; de 1–10 Gy; y > 10 Gy, lo cual resulta de utilidad en las estimaciones de dosis para exposiciones con neutrones a dosis extremadamente altas donde las estimaciones se encuentran limitadas por el proceso de saturación observado en la formación de anillos. El índice PCC muestra correlación con la dosis de radiación y decrece con la dosis. Un valor del índice PCC menor que 1 indicó que la dosis de radiación estuvo por encima de 10 Gy. Por estos resultados se propone el “índice PCC” como un biomarcador para la clasificación rápida de personas expuestas a altas dosis de irradiación con neutrones. Los coeficientes de las curvas se dan en la publicación que se adjunta en el Anexo 2.

5) La demostración experimental de que es posible a altas dosis cuantificar anillos y por lo tanto estimar dosis con la técnica de PCC fusión, que es anterior a la PCC química, elimina la necesidad de cultivar los linfocitos, lo cual ofrece el método citogenético más expedito publicado hasta el momento para la estimación de altas dosis en accidentes.

Nos propusimos extender las experiencias y buenos resultados del conteo de anillos en el PCC-Rch para las altas dosis a la técnica del PCC fusión (PCC-Rf) por su inmediatez, con el fin de poner a disposición de la emergencia un método que permitiera obtener estimaciones de altas dosis de radiación en el menor tiempo. Se realizó la fusión de células y la inducción de PCCs utilizando polietilenglicol. Los detalles técnicos se ofrecen en la publicación que se adjunta en el Anexo 4.

El protocolo de fusión utilizado probó su efectividad a dosis tan altas como 20 Gy, permitiendo el análisis de cromosomas en anillos y excesos de fragmentos. Las irradiaciones, la fusión y la preparación de los extendidos se realizaron en el laboratorio de citogenética del Instituto Demókritos de Atenas. Las evaluaciones de las muestras preparadas se hicieron en ambos laboratorios, el griego y el cubano. La relación dosis efecto obtenida entre la frecuencia de anillos y la dosis fue lineal: $Y = (0.088 \pm 0.005) \times D$. Se demostró que el ensayo PCC-Rf es apropiado como biodosímetro para la estimación de las altas dosis de radiación y los resultados pueden obtenerse inmediatamente después de la recepción de la muestra en el laboratorio sin necesidad de cultivar los linfocitos. Debemos destacar que independientemente del análisis que pueda realizarse de forma automática, el PCC-Rf puede efectuarse directamente bajo el microscopio y ofrece un rápido, fácil y preciso método para la estimación de la dosis.

Originalidad, impacto científico y social, introducción en la práctica y generalización:

Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba. Vol.4, No.2, Año 2014 6

- **Cuba es pionera en obtener curvas PCC-R en un amplio rango de dosis de irradiación Gamma y no se conoce que existan curvas para la irradiación con neutrones además de la nuestra.** Las curvas dosis respuesta de los nuevos indicadores incorporados al servicio de dosimetría biológica permiten estimar dosis totales y parciales en un intervalo entre 0,1 Gy y 25 Gy para radiación gamma y entre 1 Gy y 4 Gy para irradiación neutrónica. Además, con el índice PCC es posible clasificar rápidamente **exposiciones a neutrones mayores de 10 Gy.** Esto nos convierte en pioneros en el uso de estos indicadores al reportar por vez primera las ecuaciones matemáticas que correlacionan altas dosis de radiaciones con la frecuencia de PCC-R.
- La Dosimetría Biológica en el país puede realizar actualmente la **estimación ágil y precisa de la dosis de radiación absorbida en personas expuestas a altas dosis** de radiación, que antes de la realización de estos estudios no eran alcanzables, lo cual es un elemento primario para seleccionar el tratamiento médico más adecuado para salvar la vida de las personas afectadas.
- Esta respuesta profesional y altamente calificada **contribuye directamente al sistema de respuesta a emergencias radiológicas** que ha creado el país en caso de ocurrir contingencias y amplía las posibilidades de contribuir al esclarecimiento de cualquier suceso radiológico anormal que pueda ocurrir en la región, pues Cuba ha comenzado a extender la técnica PCC-Rch a los restantes laboratorios de dosimetría biológica en América Latina.
- El desarrollo alcanzado en la Dosimetría Biológica por el Laboratorio de Radiobiología del CPHR se refleja en resultados prácticos que **nos ubican entre los países con capacidad para realizar estimaciones dosimétricas** utilizando un conjunto indicadores citogenéticos en casos de accidentes nucleares o radiológicos.

Referencias bibliográficas

- (1) IAEA (2011) Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. EPR-Biodosimetry. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- (2) Gotoh E, Tanno Y and Takakura K (1995) Simple biodosimetry method for use in cases of high-dose radiation exposure that scores the chromosome number of Giemsa-stained drug-induced prematurely condensed chromosomes (PCC). Int J Radiat Biol **81**(1): 33-40.
- (3) Hayata I, Kanda R, Minamihisamatsu M *et al* (2001) Cytogenetical Dose Estimation for 3 Severely Exposed Patients in the JCO Criticality Accident in Tokaimura. J Radiat Res, **42**: Suppl., 149–155.
- (4) Pantelias G E, Maillie H D (1985) Direct analysis of radiation-induced chromosome fragments and rings in unstimulated human peripheral blood lymphocytes by means of the premature chromosome condensation technique. Mutat. Res. 149: 67-72.

(5) Dolphin GW (1969) Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. Handling of radiation Accident (Proc. Int. Symp. Vienna) IAEA, Vienna, 215-224.

(6) Lindholm C, Stricklin D, Jaworska A, *et al* (2010) Premature Chromosome Condensation (PCC) Assay for Dose Assessment in Mass Casualty Accidents. *Radiat Res* **173**(1): 71-78.