

## **Cromosomas Condensados Prematuramente para la Dosimetría Biológica en Cuba.**

**Romero Aguilera I.<sup>1\*</sup>, Lamadrid Boada A. I.<sup>1</sup>, González Mesa J. E.<sup>1</sup>, Mandina Cardoso T.<sup>1</sup> y García Lima O.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones, Calle 20 No. 4113, Playa, La Habana, Cuba

### **RESUMEN**

El objetivo del trabajo es presentar el estado de la implementación en el Servicio de Dosimetría Biológica de Cuba de los ensayos Anillos en Cromosomas Condensados Prematuramente mediante sustancias químicas y por fusión conocidos como *PCC-R-ch* y *PCC-R-f* por sus siglas en inglés respectivamente. Estos ensayos tienen aplicación para estimar altas dosis de radiación en accidentes radiológicos.

La implementación del *PCC-R-ch* ha incluido: i) La obtención de curvas dosis – respuesta con radiación gamma en el intervalo entre 5-25Gy y hasta 4Gy para neutrones; ii) La modelación de irradiaciones parciales *in vitro* en proporciones desde 10 a 90%, asociada al cálculo de una  $D_0 = 10.9\text{Gy}$ , demostrando la posibilidad de identificar con este ensayo la irradiación parcial, de estimar la fracción inicial de células irradiadas, así como de calcular la dosis que recibió dicha fracción; y iii) La reducción del tiempo de cultivo hasta 40 y 42 horas obteniéndose las curvas dosis – respuestas en el intervalo entre 1 y 10Gy.

En la técnica de *PCC-R-f* los linfocitos fueron condensados prematuramente mediante fusión con células CHO a las 8 y 24h de irradiados a dosis entre 5-20Gy. Las frecuencias de anillos/célula se mantuvieron constantes entre los dos tiempos de reparación utilizados obteniéndose una curva dosis – respuesta lineal para este intervalo de dosis.

### **1. INTRODUCCIÓN**

El nuevo reto que esta enfrentando la dosimetría biológica a escala internacional es la respuesta a exposiciones masivas a las radiaciones ionizantes. Este escenario ha llevado al desarrollo de nuevos métodos biológicos para las estimaciones de dosis, así como al reajuste de procedimientos en la dosimetría citogenética, el mejor dosímetro biológico de la actualidad.

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 así como conocer su distribución en el cuerpo 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.

El Ensayo del Dicéntrico es el “estándar” de oro en la estimación de las dosis de radiación recibidas por las personas sobre-expuestas [1], ya que la frecuencia de cromosomas dicéntricos y anillos céntricos por célula es muy baja en personas no irradiadas y posee una relación dosis – efecto bien conocida y descrita. Sin embargo, este ensayo tiene dos

---

<sup>1</sup> correo electrónico de la autora: [ivonne@cphr.edu.cu](mailto:ivonne@cphr.edu.cu)

desventajas fundamentales: 1) está limitado a dosis por debajo de los 8 Gy debido a la saturación de las curvas dosis – respuestas y al retardo en el avance del ciclo celular, lo cual provoca que para las altas dosis se obtengan un bajo número de linfocitos en mitosis [2]; y 2) el largo tiempo necesario entre la toma de la muestra y la obtención de los resultados para la estimación de la dosis (aproximadamente 5 días sin análisis automatizado y tomando en cuenta el número de observadores disponibles en cada laboratorio).

Desde hace algunos años la laguna en la estimación de las altas dosis (5 – 25 Gy) se llenó con el Ensayo de Condensación Prematura de los Cromosomas (PCC, por sus siglas en inglés), el cual permite obtener cromosomas condensados en todas las fases del ciclo celular (G1, G2, S, M) mediante el uso de inhibidores químicos de las proteínas fosfatasa tipos 1 y A2 [3, 4, 5], lo cual aumenta el índice mitótico en comparación con la dosimetría citogenética convencional [5, 6]. En la técnica PCC químico cuando solo se analizan las aberraciones cromosómicas en forma de anillos (*PCC-R-ch*), las curvas dosis – efecto solo se saturan después de los 20 Gy [7].

Hasta hace unos años pocos laboratorios del mundo tenían establecidas curvas PCC-R en un amplio rango de dosis Gamma [7] y no existían curvas para la irradiación con neutrones; tampoco se habían obtenido resultados satisfactorios en la identificación de la irradiación parcial utilizando este ensayo. Por otro lado tampoco se habían explotado las ventajas del elevado índice mitótico que se obtiene, el cual permitiría optimizar el ensayo disminuyendo el tiempo de cultivo.

La fusión con células CHO (Chinese hamster ovary), es otra manera de inducir la Condensación Prematura de los Cromosomas de forma inmediata [8]. Este ensayo permite obtener cromosomas condensados en la fase G<sub>0</sub>, por lo que se elimina el cultivo de los linfocitos, y además se analizan ambos tipos de linfocitos T y B con lo cual se examina un mayor número de linfocitos. Durante años, este ensayo solo se utilizó cuantificando fragmentos lo cual lo hace engorroso y lento para la dosimetría biológica, y sería muy útil la elaboración de curvas dosis – respuesta utilizando la frecuencia de anillos por célula para su uso en la dosimetría citogenética.

Durante más de ocho años el Laboratorio de Radiobiología del Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones (CPHR) de Cuba, en colaboración con el Institute de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) de Francia y el Institute of Nuclear & Radiological Sciences & Technology, Energy & Safety of NCSR “Demokritos” de Grecia, ha trabajado en el desarrollo de curvas dosis – respuesta para los ensayos Anillos en Cromosomas Condensados Prematuramente mediante sustancias químicas y por fusión (*PCC-R-ch* y *PCC-R-f* por sus siglas en inglés respectivamente), así como en la optimización del ensayo *PCC-R-ch*.

El presente trabajo tiene como objetivo presentar el estado de la implementación en el Servicio Dosimetría Biológica en Cuba de los ensayos *PCC-R-ch* y *PCC-R-f*; lo cual incluye: 1) en el ensayo *PCC-R-ch*: i) las curvas dosis – respuesta con diferentes calidades de radiación (gamma y neutrones), ii) la estimación de dosis y fracción de células irradiadas en el caso de la irradiación parcial iii) la disminución del tiempo de cultivo hasta 40 h; y 2) en el ensayo *PCC-R-f*: las curvas dosis – respuesta para diferentes tiempos de reparación post-irradiación.

Estos trabajos se realizaron en el marco de varios proyectos OIEA<sup>2</sup> para el fortalecimiento de la respuesta a emergencias radiológicas y la capacitación técnica. Los conocimientos adquiridos han sido diseminados entre los laboratorios de dosimetría citogenética de la región latinoamericana.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Implementación del Ensayo PCC-R-ch

#### Aspectos Generales

##### *Irradiación:*

Durante todas las irradiaciones se siguieron las recomendaciones del OIEA [9, 1].

Siempre después de la irradiación, la sangre se mantuvo a 37°C durante 2 horas, permitiendo actuar los mecanismos de reparación celular.

##### *Ensayo PCC-R-ch*

De forma general, los cultivos de linfocitos se hicieron siguiendo el protocolo publicado por Lamadrid et al. [10]: 0.5 ml de sangre total en 4.5 ml de RPMI 1640 suplementado con L-glutamina, 20% suero fetal de ternero y 1% fitohemaglutinina (PHA). A las 24 h de comenzado el cultivo se añadió Colcemida (0.05 µg/ml), y 1 hora antes de la cosecha se añadió Calyculina A (50 nM). A las 48 horas de cultivo comenzó la cosecha: las células se trataron con solución hipotónica de KCl (0.075M) durante 8 min a 37°C y se fijaron realizando tres cambios de fijador (metanol:ácido acético, 3:1 v/v). Finalmente, se extendieron en las láminas 30 µl de la suspensión celular obtenida. Las láminas secas se tiñeron con una solución de Giemsa al 4%.

##### *Identificación y cuantificación de anillos*

Se registraron las células PCC en las fases G1, G2 y metafase. Los anillos se cuantificaron considerando como un anillo todo fragmento con un orificio visible en su centro, o sin luz en el centro cuando los anillos eran perfectamente redondos y su tamaño excedía el ancho de las cromátida en esa célula. En las células PCC en fase G2 con las cromátidas separadas y en metafase, cuando se observaron dos anillos idénticos de simple cromátida se registró un anillo considerando que la pareja observada procedía originalmente del mismo cromosoma.

---

<sup>2</sup> RLA/0/041 "Strengthening Human Resource Development and Nuclear Technology Support for the Region and Specific Countries".

RLA/9/054, RLA/9/061, RLA/9/074 y actualmente RLA/9/076 "Strengthening Systems for Preparedness and Response to Nuclear and Radiological Emergencies" (TSA5).

CRP No. 17494 "Reducing the Time and Reagents Required for Cytogenetic Dosimetry Response in Mass Casualty Scenario".

Siempre que fue posible se analizaron al menos 100 anillos o 500 células PCC por cada dosis, por donante.

### *Frecuencia y distribución de PCC-R por célula*

La frecuencia de PCC-R por célula en todos los estadios del ciclo celular se calculó como la relación entre los PCC-R encontrados y el total de células PCC observadas.

La prueba  $u$  de Papworth se utilizó para evaluar si la dispersión de las aberraciones describía una distribución de Poisson [11].

#### 2.1.1. Curvas dosis – respuesta

La metodología detallada para la elaboración de las curvas dosis – respuesta para radiación gamma y neutrones está descrita en Lamadrid et al. [10, 12].

#### *Irradiación*

Radiación gamma: La sangre completa de dos donantes se expuso a dosis de 0, 5, 7.5, 10, 20 y 25Gy usando una fuente de  $^{60}\text{Co}$  (ICO-4000, Laboratorio de Metrología del IRSN, Francia) a una tasa de dosis de 0.5 Gy/min.

Neutrones: La sangre completa de cinco donantes se expuso a neutrones de fisión en las instalaciones de SILENE (Valduc, Francia) en dos series experimentales: el primer experimento con dos donantes la sangre se irradió a dosis de 0, 5.4, 5.6, 9.4, 12.7 y 26.1Gy, y el segundo con tres donantes incluyó las dosis 0, 1.0, 1.7 y 3.8Gy; la energía media del espectro de neutrones fue 0.49 MeV.

#### *Ensayo PCC-R-ch. Identificación y cuantificación de anillos*

El ensayo *PCC-R-ch*, la identificación y cuantificación de anillos se realizaron como se describió en los aspectos generales.

#### *Ajuste de las curvas dosis – respuesta*

La curva dosis – respuesta se ajustó acorde al modelo lineal, usando el método de la máxima verosimilitud descrito por Papworth [13]. Aunque la curva se ajustó en dos grupos de experimentos, los mismos se llevaron a cabo por el mismo equipo de trabajo y con las mismas condiciones experimentales.

#### 2.1.2. Irradiación Parcial

La metodología detallada para la identificación, estimación de fracción irradiada y la estimación de la dosis está descrita en Romero et al. [14].

#### *Irradiación*

Radiación gamma: La sangre completa de tres donantes se expuso a dosis de 0, 1, 5, 7.5, 10, 15 y 20Gy (ICO-4000, Laboratorio de Metrología del IRSN, Francia) a una tasa de dosis de 0.5 Gy/min.

Para simular las irradiaciones parciales (SIP), después de las dos horas de reparación, se mezcló a sangre irradiada a 10, 15 y 20 Gy con sangre no irradiada del mismo donante hasta obtener proporciones finales de 10, 25, 50, 75 y 90 % de sangre irradiada. Adicionalmente se mezcló sangre irradiada con 1, 5, y 7.5 Gy con sangre no irradiada en proporción final del 50 %. Todos los datos se utilizaron para la estimación de la  $D_0$  [14].

### *Ensayo PCC-R-ch. Identificación y cuantificación de anillos*

Después de mezclada la sangre, el ensayo *PCC-R-ch* y la identificación y cuantificación de anillos se realizaron como se describió en los aspectos generales.

### *Análisis Estadístico*

#### Curva Dosis – Respuesta

La curva dosis respuesta se ajustó en el intervalo de 0 – 20 Gy utilizando los datos del 100% de la sangre irradiada de los 3 donantes independientemente, usando el software DoseEstimate [15]. Las diferencias entre donantes se comprobaron usando la prueba F para la comparación de las curvas y la prueba t de Student para la comparación de las frecuencias.

#### Identificación de la irradiación parcial.

La identificación de la irradiación parcial se realizó analizando las distribuciones de anillos PCC por célula. El valor  $u$  (normalización del índice de dispersión:  $\sigma^2/Y$ ) se analizó para cada dosis y cada proporción de sangre irradiada, asumiendo una distribución de Poisson si  $u \leq 1.96$ , y sobredispersión si  $u > 1.96$ . El valor  $u$  se calculó por el programa DoseEstimate [15].

El porcentaje de identificaciones correctas de la simulación de irradiación parcial ( $\%SIP_{ID}$ ) se calculó con la ecuación (1):

$$\%SIP_{ID} = \frac{\#SIP_{u>1.96}}{\#SIP_T} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde  $\#SIP_{u>1.96}$  es el número de distribuciones por célula que no siguió Poisson y  $\#SIP_T$  es el número total de SIP evaluadas.

#### Cálculo del valor de $D_0$

La fracción sobreviviente ( $S$ ) se calculó usando la ecuación reportada por Matsubara et al [16]. Las frecuencias de anillos por célula necesarias para el cálculo de  $S$  se obtuvieron de las irradiaciones totales y parciales simuladas. La  $D_0$  se estimó utilizando la regresión lineal entre  $\ln(S)$  y la dosis. La regresión lineal se forzó a pasar por los puntos del 100% de sobrevivida y la dosis cero (para más detalle ver *Material Suplementario* de Romero et al. [14]).

#### Estimación de la fracción expuesta y su dosis

La fracción irradiada y la dosis se estimaron aplicando el método de Poisson contaminado originalmente propuesto para el ensayo del dicéntrico [17, 1] y utilizando la curva de calibración establecida en este trabajo y las frecuencias de anillos estimadas en la fracción

irradiadas para cada donante. (para más detalle ver *Material Suplementario* de Romero et al. [14]).

Se consideraron aceptables las dosis estimadas que cayeron dentro del 30% de la dosis real [18] y las fracciones estimadas dentro del 10% del valor real de la fracción irradiada.

El porcentaje de estimaciones de dosis correctas ( $\%D_{correcta-SIP}$ ) se calculó con la ecuación (2):

$$\%D_{correcta-SIP} = \frac{\#D_{SIP-30\%}}{\#D_{SIP-T}} \cdot 100 \quad (2)$$

Donde  $\#D_{SIP-30\%}$  es el número de SIP estimadas que cayeron dentro del 30% de la dosis física, y  $\#D_{SIP-T}$  es el número total de SIP estimadas.

El porcentaje de fracciones de sangre irradiada correctas ( $\%F_{correcta}$ ) se calculó con la ecuación (3):

$$\%F_{correcta} = \frac{\#F_{10\%}}{\#F_T} \cdot 100 \quad (3)$$

Donde  $\#F_{10\%}$  es el número de fracciones de sangre irradiada estimadas que cayeron dentro del 10% de la fracción irradiada real, y  $\#F_T$  es el número total de fracciones irradiadas estimadas.

### 2.1.3. Disminución del tiempo de cultivo

La metodología detallada para la elaboración de las curvas dosis – respuesta con la disminución del tiempo está descrita en Romero et al. [19].

#### *Irradiación*

Radiación gamma: La sangre completa de dos donantes se expuso a dosis de 0, 1, 2, 5, 7.5 y 10 Gy (Theratronix—Phoenix, Laboratorio Secundario de Calibración del CPHR, Cuba) a una tasa de dosis de 1.2 Gy/min.

#### *Ensayo PCC-R-ch*

Los cultivos de linfocitos se realizaron de forma similar a lo descrito anteriormente con modificaciones al tiempo total de cultivo, el cual se redujo a 40 y 42 horas [19].

#### *Identificación y cuantificación de anillos*

La identificación y cuantificación de anillos se realizó como se describió en aspectos generales.

#### *Ajuste de las curvas dosis – respuesta*

Las curvas dosis – respuesta para los tiempos 40 y 42 horas se ajustaron siguiendo el modelo lineal – cuadrático utilizando el programa DoseEstimate [15].

Las diferencias entre los donantes y los tiempos de cultivo se evaluaron utilizando la prueba F para comparar las curvas. Las frecuencias se compararon usando la prueba t de Student.

## ***2.2. Implementación del Ensayo PCC-R-f***

La metodología detallada para la elaboración de las curvas dosis – respuesta para radiación gamma y neutrones está descrita en Lamadrid et al. [20].

### *2.2.1. Curvas dosis – respuesta*

#### *Irradiación*

Radiación gamma: La sangre completa y los linfocitos aislados se expusieron a dosis de 0, 5, 10, 15 y 20 Gy (GammaCell 220 irradiator, Atomic Energy of Canada, Ltd., Ottawa) a una tasa de dosis de 0.54 Gy/min.

Después de la irradiación de las muestras de linfocitos aislados y de sangre total, se mantuvieron a 37°C durante 8 y 24 horas permitiendo actuar los mecanismos de reparación celular.

#### *Ensayo PCC-R-f*

El protocolo de cultivo y colecta de células CHO se realizó según lo descrito por Lamadrid et al. [20]. Brevemente: los cultivos de células CHO se hicieron en medio McCoy's 5A suplementado con 10% de suero fetal, 1% de L-glutamina y antibióticos y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>, manteniéndolo como cultivos monocapa. Se añadió colcemida (0.1 g/ml) cada 4 horas y las células mitóticas acumuladas en ese tiempo fueron colectadas por “desprendimiento selectivo” repitiendo ese proceso varias veces y utilizadas como un suplemento de células mitóticas para inducir los PCC en los linfocitos.

La fusión y la inducción de los PCCs utilizando polyethylene glycol (PEG) se realizó siguiendo el protocolo publicado por Pantelias y Maillie [8]. Las células CHO mitóticas y los linfocitos no estimulados (G0-PBLs) se lavaron independientemente con medio McCoy's 5A libre de suero y se mezclaron en una proporción 1:5 en presencia de colcemida. Después de centrifugar a 200 × g durante 5 minutos, el sobrenadante se descartó y se añadieron 0.15 ml de polietilenglicol al 50% (p/v) y se dejó durante 1 min. Posteriormente se añadió 1.5 ml of PBS y la suspensión celular se centrifugó a 200 × g durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y el botón de células se resuspendió en 0.7 ml de medio McCoy's 5A a 37°C. La fusión y la inducción de PCCs concluyeron a los 50–60 minutos a 37°C. Las suspensiones de células PCC se trataron con una solución hipotónica de KCl (0,075 M) durante 30 minutos a 37°C y se fijaron con una mezcla de metanol: ácido acético, 3:1 v/v. Finalmente, las células se extendieron por goteo en láminas portaobjetos. Las láminas secadas al aire se colorearon con una solución de Giemsa al 3%.

#### *Identificación y cuantificación de anillos*

Los linfocitos humanos fueron identificados manualmente, como un grupo de cromosomas monofilares (muy cerca de los cromosomas CHO mitóticos) los que pueden ser distinguidos fácilmente por su morfología y grado de condensación. Se consideraron anillos PCC-R-f las cromátidas con forma circular cerradas con un orificio visible o sin él.

Para cada punto experimental se contaron al menos 100 anillos, como se sugiere para el ensayo de dicéntricos para obtener un estimado preciso de la dosis.

#### *Ajuste de las curvas dosis – respuesta*

La frecuencia de PCC-R-f se evaluó como la relación entre el número de anillos contados y el número de células analizadas.

La prueba u de Papworth se utilizó para evaluar si la dispersión de las aberraciones describía una distribución de Poisson [11].

Las curvas dosis – efecto se ajustaron al modelo lineal con la ayuda del programa DoseEstimate [15]. La significación de la pendiente (coeficiente alfa) se comprobó con la prueba t y la bondad de ajuste con la prueba de  $X^2$ . Las diferencias entre las pendientes de las curvas se comprobaron mediante la prueba F, mientras que las diferencias entre las frecuencias de las aberraciones se hicieron mediante la prueba t.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

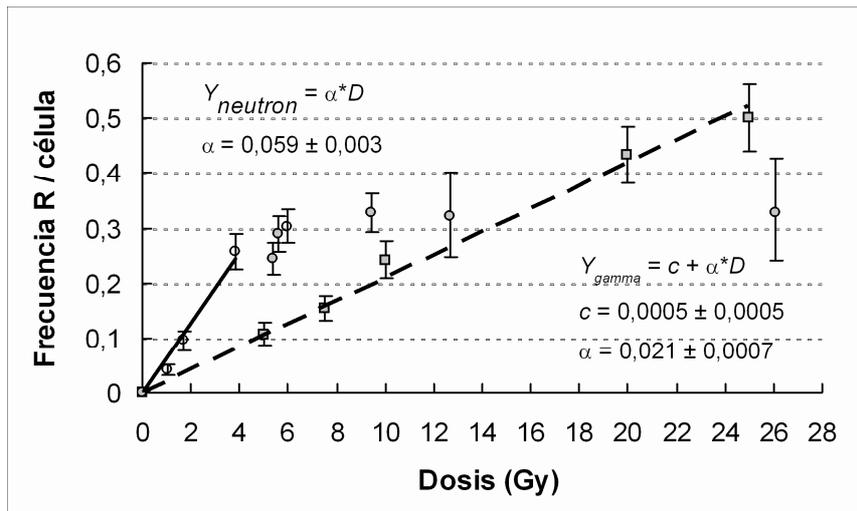
#### **3.1. PCC-R-ch.**

##### Curvas dosis – respuesta para radiación gamma

Las frecuencias (Y) de anillos observados mostraron una relación lineal con la dosis (D) representada por la ecuación  $Y = c + \alpha \cdot D$ , cuyos coeficientes fueron:  $c = 0,0005 \pm 0,0005$  y  $\alpha = 0,021 \pm 0,0007$  (Figura 1).

Esta constituye la primera curva de calibración publicada 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-R-ch [10].

El mejor ajuste lineal obtenido concuerda con los modelos planteados para la formación de aberraciones cromosómicas para irradiaciones de baja transmisión lineal de energía (LET) y la frecuencia de anillos encontrada resulta inferior a la reportada por Kanda et al. [7], probablemente debido a diferencias en los criterios de conteo. El ensayo es de utilidad en casos de sobre-exposiciones accidentales, donde la dosis recibida por la víctima esté por encima de 5 Gy, pues este ensayo soluciona las principales dificultades que presenta la técnica convencional de dicéntricos a esas dosis que son la saturación de los dicéntricos y el bajo índice mitótico de los cultivos.



**Figura 1. Ajuste de la curvas dosis – respuesta en el ensayo *PCC-R-ch* para radiación gamma (---) y neutrones (—). Los datos para la curva de radiación gamma (◻) provienen de la suma de dos donantes, para neutrones en la primera serie experimental (○) de la suma de dos donantes y en la segunda (○) de tres donantes; en todos los casos las barras de error representan el intervalo de confianza del 95%.**

#### Curvas dosis – respuesta para neutrones

En la primera serie de experimentos se analizaron 4564 células. Esta serie incluyó dosis entre 5.4 y 26.1Gy. El mejor ajuste entre las frecuencias y las dosis irradiadas fue lineal pero la bondad de ajuste resultó ser insuficiente ( $r^2 = 0.90$ ).

Para evaluar la pendiente de la curva a dosis por debajo de 5 Gy se realizó una segunda serie experimental en la región de bajas dosis, considerando que exposiciones a irradiación con neutrones pueden ser de diferentes magnitudes y de 1-5 Gy pueden causar daños comparables a altas dosis de radiación gamma. En esta serie se analizaron 6455 células mostrando una relación lineal en el intervalo desde 0 a 3.8 Gy.

En total se evaluó el comportamiento de la frecuencia de anillos PCC en 11 019 células PCC intervalo de dosis de 1-26 Gy de irradiación con neutrones de fisión. Cuando comparamos las frecuencias de anillos PCC entre los donantes no encontramos diferencias significativas a ninguna dosis, por lo tanto los donantes fueron unidos para ajustar la curva de calibración. Las distribuciones de los anillos por célula fueron del tipo Poisson o Neyman.

El mejor ajuste de las frecuencias de anillos observadas desde 0 a 3.8 Gy se obtuvo con el modelo lineal  $Y = \alpha \cdot D$ , como era de esperarse para radiaciones de alta transmisión lineal de energía (LET), con un coeficiente  $\alpha = 0,059 \pm 0,003$ , ( $t = 19.7$ ,  $p < 0.05$ ), observándose una saturación de los anillos PCC en un valor cercano a los 4 Gy, sin embargo se pudo analizar células expuestas hasta los 26 Gy (Figura 1).

El uso de amplio intervalo desde 1 a 26 Gy y la posibilidad de obtener células analizables en ese intervalo permitió una caracterización más precisa de la respuesta a la dosis y al proceso de saturación. En trabajos previos con dicéntricos se habían utilizado intervalos entre 0 y 3

Gy supuestamente por dificultades asociadas con la capacidad de división después de altas dosis y radiaciones de alto LET [21, 22, 23]. Una excepción lo constituye el intervalo de 1-8 Gy reportado por Wang et al. [24], donde no fue posible ajustar la relación dosis efecto por encima de 4 Gy probablemente debido a la saturación de los dicéntricos.

El valor del coeficiente alfa es un orden menor que los coeficientes alfa para las curvas de neutrones que aparecen en la literatura para dicéntricos [21] lo cual se corresponde con la diferencia de un orden en la formación de anillos y dicéntricos [21, 22, 23].

En conclusión se obtuvo por primera vez una curva de calibración para irradiación con neutrones, empleando el método de PCC-R inducido químicamente, la cual puede ser utilizada en caso de exposición accidental a este tipo de radiación y obtener una estimación precisa de la dosis hasta 4 Gy.

### Irradiación Parcial

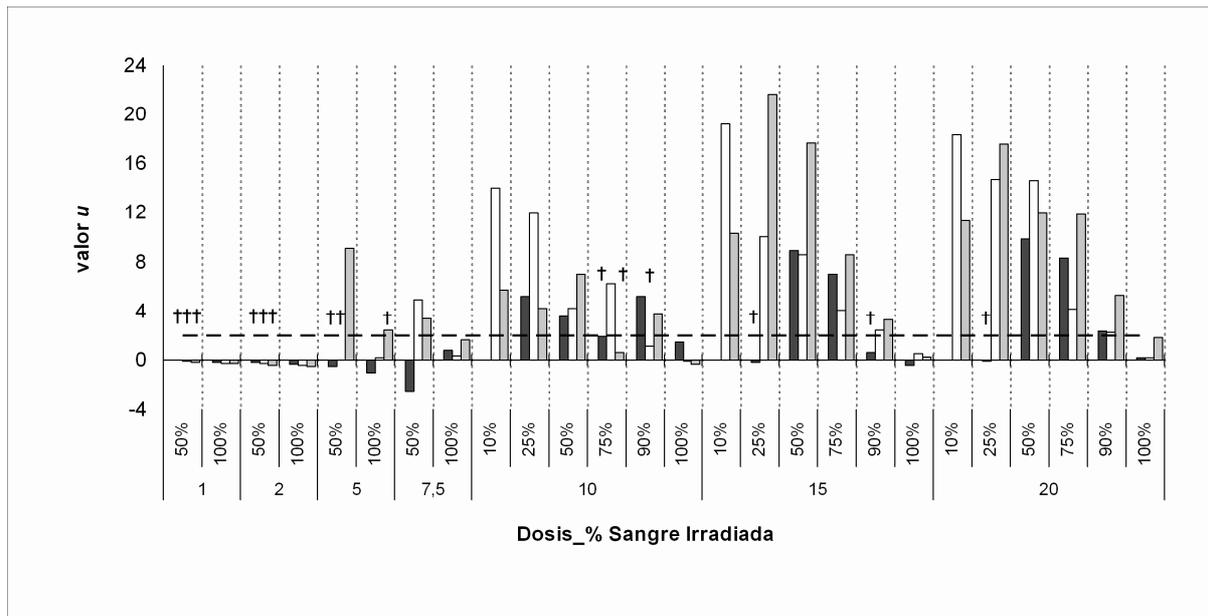
La estimación de la dosis y de la fracción del cuerpo irradiada es una información importante en la respuesta médica primaria, en el caso de un accidente radiológico. El ensayo *PCC-R-ch*, es relativamente nuevo y hasta el momento se le había dedicado poca atención a su aplicabilidad en las irradiaciones parciales [25].

Identificación de SIP: En la mayoría de las SIP el valor del estadígrafo  $u$  fue mayor de 1.96 indicando sobredispersión que es lo esperado en el caso de irradiaciones parciales (Figura 2). Al analizar cada donante individualmente obtuvimos una identificación correcta de las SIP (i.e.  $u > 1.96$ ) en el 60 % de las muestras del donante 1, en el 83 % de las muestras del donante 2 y en el 88% de las muestras del donante 3. De las 11 SIP que no pudieron identificarse, 5 correspondieron a las dosis más bajas ensayadas: 1 y 5 Gy. El valor de  $u$  fue mas elevado en general en las fracciones bajas de SIP con una tendencia a disminuir con el incremento en la fracción de sangre irradiada.

La posibilidad de distinguir entre irradiaciones parciales y totales analizando la distribución de anillos PCC entre las células es decisiva para la aplicación de este ensayo en situaciones accidentales. Los resultados obtenidos son similares a los reportados usando el ensayo del dicéntrico, donde del 86% al 100% de las muestras en simulaciones de irradiaciones totales, y del 60-100% de las muestras en simulaciones de irradiaciones parciales fueron identificadas correctamente por el valor  $u$  [26, 18, 27, 28].

En este trabajo aproximadamente la mitad de las identificaciones erróneas estuvieron entre 1 y 5 Gy, donde la dosis y la fracción irradiada por si mismas conllevan grandes incertidumbres estadísticas debido al pequeño número de aberraciones encontradas.

Valor  $D_0$ : El valor de  $D_0$  obtenido fue 10.9 Gy según el método de Matsubara et al. [16]. Dicho valor debe ser considerado cuando se usa el ensayo *PCC-R-ch* en situaciones accidentales, donde se sospeche irradiaciones parciales del cuerpo.



**Figura 2. Evaluación de la distribución de Poisson mediante la prueba  $u$  de Papworth en los tres donantes (■ donante 1, □ donante 2 y ▒ donante 3). En la figura se representan todas las proporciones y dosis; en el caso del donante 1 no se obtuvieron datos para 10%. Las identificaciones incorrectas de SIP se resaltaron (†).**

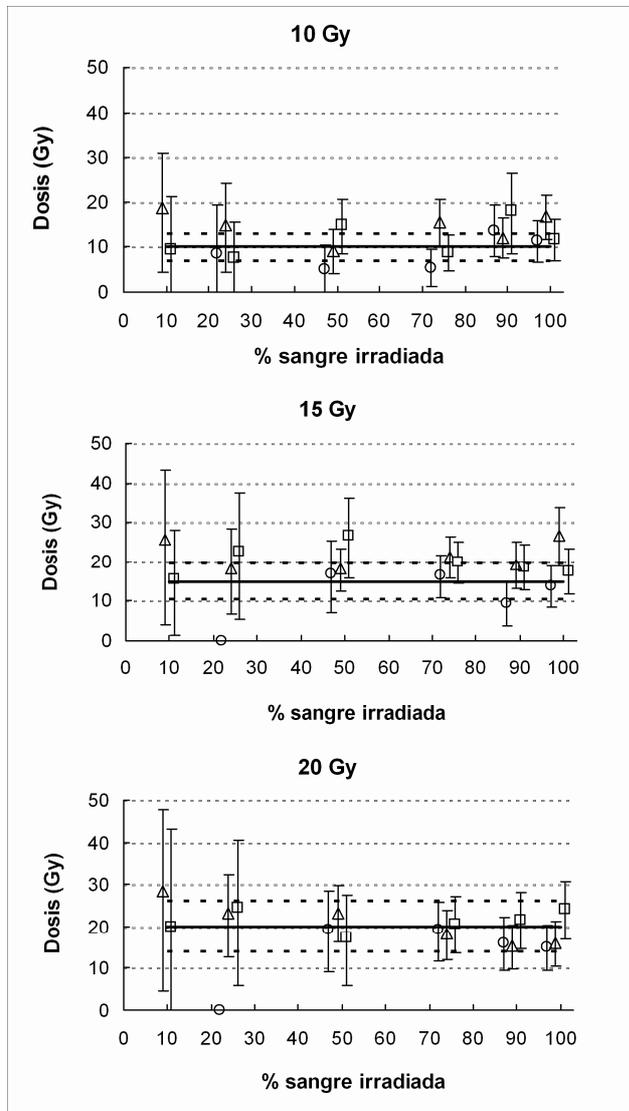
La  $D_0$  obtenida aquí es mucho mayor que los valores reportados previamente en el ensayo del dicéntrico para rayos X ( $D_0 = 2.7$  Gy [26],  $D_0 = 3.8$  Gy [28]) o para radiación gamma ( $D_0 = 3.5$  Gy [16],  $D_0 = 3.0$  Gy [29]). Las diferencias pueden ser explicadas por la naturaleza de los diferentes indicadores medidos en cada ensayo. Mientras que en el ensayo del dicéntrico convencional la  $D_0$  esta basada en la capacidad de los linfocitos G0 irradiados para llegar a metafase, la  $D_0$  medida aquí incluye además otras células capaces de llegar a la fase G2 del ciclo celular. El hecho de que en el ensayo PCC-R se analicen células en casi todas las fases del ciclo celular incide también en la mayor frecuencia de anillos por célula detectada en este ensayo comparándolo con el ensayo del dicéntrico donde se analizan únicamente células en metafase.

Es de suponer que el uso de diferentes condiciones de cultivo, así como las diferencias en las respuestas a la estimulación de los linfocitos en los cultivos de diferentes donantes influya en los índices mitóticos o el índice PCC y por consiguiente, bajo similares condiciones de irradiación la sobrevivencia de los linfocitos (medida por el número de metafases o células PCC) pueda variar. Parece razonable sugerir que los valores  $D_0$  deben derivarse individualmente por los laboratorios de dosimetría biológica, como se recomienda en los trabajos realizados sobre este aspecto.

#### Estimación de la dosis y la fracción irradiada

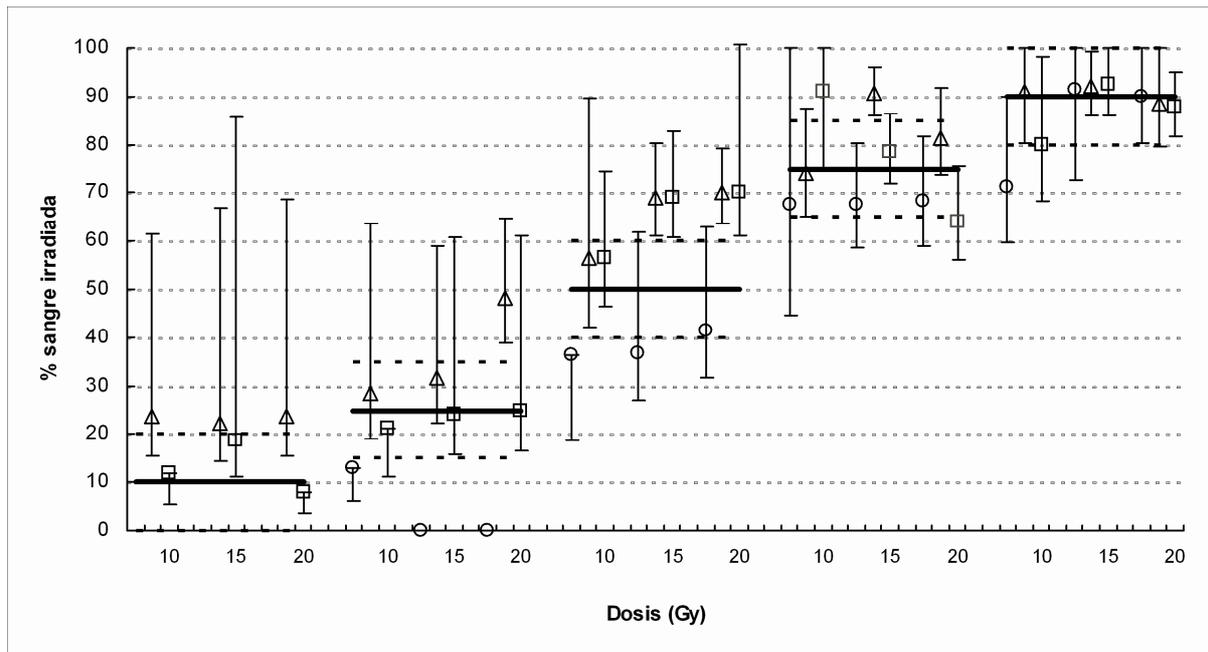
En la figura 3 se presentan los resultados obtenidos en las estimaciones de dosis. En general el 64% de las dosis estimadas de las muestras de SIP clasificaron como aceptables, a 10 Gy el

43%, a 15 Gy el 50% y a 20 Gy el 86%; observando un tendencia a aumentar el número de estimaciones de dosis aceptables con el aumento de la dosis y del porcentaje de sangre irradiada.



**Figura 3. Dosis estimadas con su intervalo de confianza del 95%, a partir de la sangre irradiada a 10, 15 y 20 Gy, para los tres donantes (○ donante 1, △ donante 2 y □ donante 3). Las líneas sólidas representan la dosis física y las líneas discontinuas el  $\pm 30\%$  de la dosis física.**

En la figura 4 se graficaron los resultados obtenidos de las estimaciones de la fracción de sangre irradiada inicialmente para cada donante. Las mejores estimaciones se hicieron con el donante 3 (~ 60% de estimaciones correctas), mientras que las peores fueron con el donante 1 (~50 % correctas) con una tendencia a la sobreestimación de la fracción irradiada.



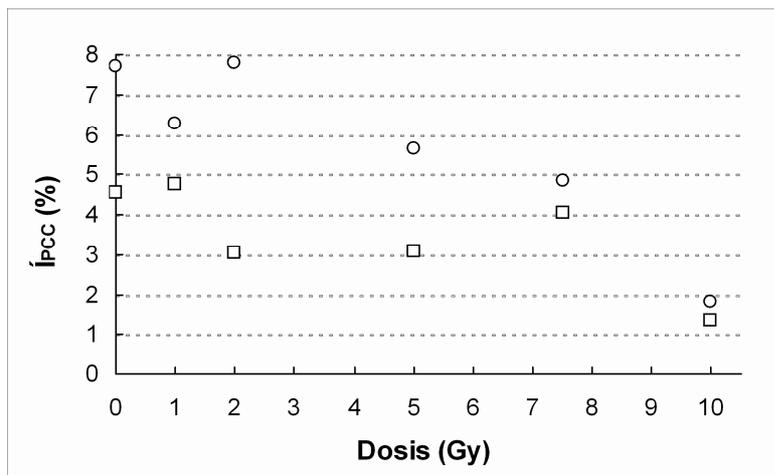
**Figura 4. Fracción de sangre irradiada estimada con su intervalo de confianza del 95%, para 10, 25, 50, 75, 90% de SIP, para las dosis 10, 15 y 20 Gy. Se representaron los valores individuales de los tres donantes (○ donante 1, △ donante 2 y □ donante 3). Las líneas sólidas representan la fracción de sangre real irradiada y las líneas discontinuas el intervalo del  $\pm 10\%$  de la fracción de sangre real irradiada.**

Las respuestas de los donantes fueron similares en todo el rango de dosis usado en estos experimentos. Sin embargo, la aparente saturación del ensayo en un donante por encima de los 15 Gy, no obtenida anteriormente utilizando nuestro protocolo, apoya los hallazgos previos encontrados por otros autores [25], sugiriendo la posibilidad de saturación del ensayo después de los 15 ó 20 Gy, lo cual debe ser considerado cuando se sospechen dosis por encima de los 15 Gy. Esto debe ser confirmado extendiendo el intervalo de dosis.

Con este trabajo se confirmó la potencialidad de distinguir entre irradiaciones totales y parciales analizando la distribución de anillos PCC entre las células bajo las condiciones usadas en este estudio. En tales circunstancias es posible aplicar las herramientas desarrolladas para el ensayo del dicéntrico para la estimación de la fracción irradiada y la dosis en dicha fracción. El valor de  $D_0=10.9$  Gy dio los mejores resultados en las estimaciones realizadas.

#### Disminución del tiempo de cultivo

En la figura 5 se muestran los resultados del índice PCC ( $I_{PCC-R}$ ) obtenidos para 40 y 42 horas de cultivo. A las 42 horas de cultivo se observa una disminución del  $I_{PCC-R}$  cuando aumenta la dosis por encima de 5 Gy, sin embargo esta diferencia no se observó a las 40 horas. Estos  $I_{PCC-R}$ , muestran que después de 40 ó 42 horas de cultivo es posible obtener un número suficiente de células para el análisis de anillos en el intervalo de dosis evaluado.



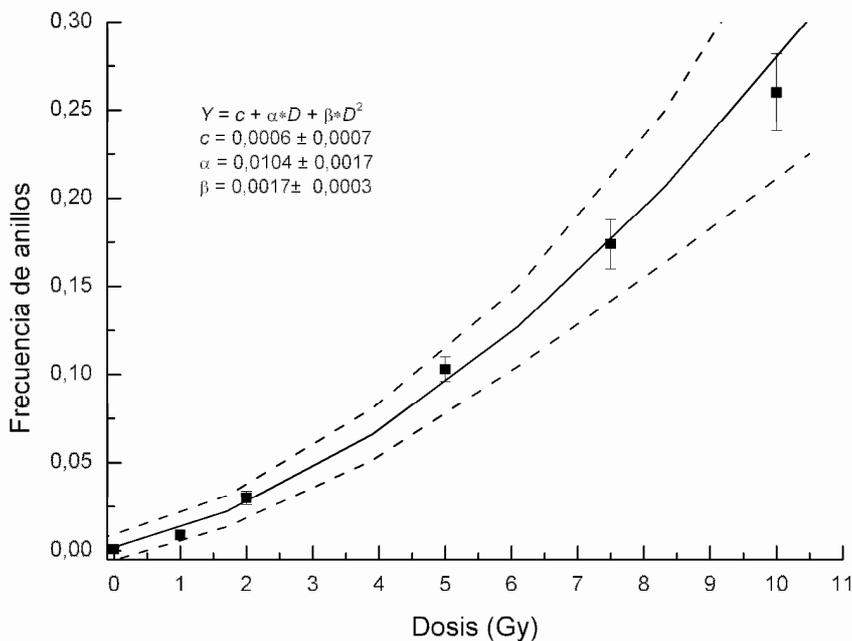
**Figura 5. Índice de proliferación obtenido para los tiempos de cultivo a 40 (□) y 42 (○) horas para el ensayo PCC-R-ch.**

Los datos de los dos donantes se utilizaron juntos porque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (prueba F, 40h  $p = 0.4718$ , 42h  $p = 0.1279$ ) entre las curvas dosis-respuesta de los donantes a los dos tiempos de cultivo ensayados.

Las variaciones en los tiempos de cultivo ensayados tampoco tuvieron influencia en las curvas dosis – respuesta (prueba F,  $p = 0.0724$ ), por lo que es posible unir los datos obtenidos a los dos tiempo de cultivo. Las frecuencias de PCC-R-ch obtenidas de los datos combinados de los dos donantes a 40 y 42 fueron similares a nuestros datos de referencia de 48 horas de cultivo (datos no mostrados) (40h vs 48h  $p = 0.2713$ , 42h vs 48h  $p = 0.7046$ ).

La curva dosis-respuesta obtenida con los datos combinados se presenta en la figura 6. Se evaluaron numerosos modelos hasta obtener el mejor ajuste de los datos al modelo. Aunque no se encontraron diferencias entre los modelos lineal y lineal-cuadrático (prueba F,  $p=0.1057$ ), el mejor ajuste se obtuvo con el modelo lineal-cuadrático  $Y = c + \alpha \cdot D + \beta \cdot D^2$  ( $\chi^2 = 4.75$ ,  $p = 0.1909$ ), con los siguientes coeficientes  $c = 0,0006 \pm 0,0007$ ;  $\alpha = 0,0104 \pm 0,0017$ ;  $\beta = 0,0017 \pm 0,0003$ .

En este trabajo presentamos una alternativa para reducir el tiempo de cultivo en 8 horas con el ensayo PCC-R cuando se sospechan dosis entre 5 y 10 Gy, y consecuentemente se obtiene una reducción del tiempo en la estimación de la dosis. Este enfoque puede ser utilizado por los laboratorios de Dosimetría Biológica trabajando con el ensayo PCC-R en situaciones reales, cuando se requieren los resultados rápidos después de la exposición a altas dosis.



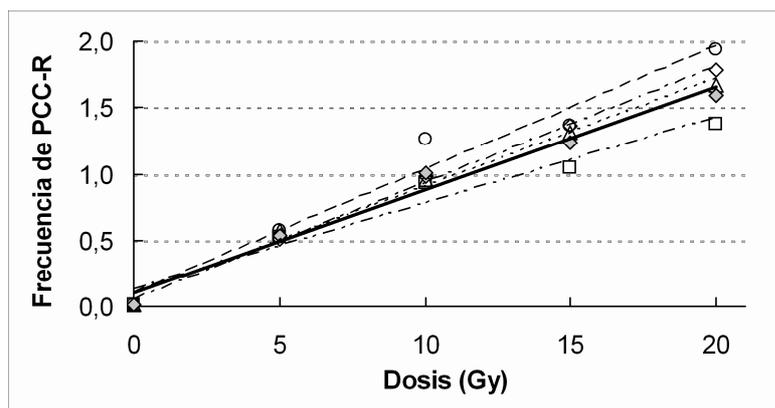
**Figura 6. Curva dosis – respuesta elaborada para el ensayo *PCC-R-ch* con disminución del tiempo de cultivo a 40 o 42 horas. Debido a las bajas dosis incluidas el mejor ajuste fue el lineal cuadrático.**

### 3.2. *PCC-R-f*.

El protocolo de fusión utilizado probó su efectividad a dosis tan altas como 20 Gy, dando un número suficiente de células PCC con morfología adecuada y permitiendo el análisis de cromosomas en anillos. Se obtuvo el mismo índice *PCC-f* de 15.5 % tanto en las células controles (0 Gy) como en la irradiadas a la dosis más alta (20 Gy).

La frecuencia de *PCC-R-f* se incrementó con el incremento de la dosis. La distribución de los anillos en las células PCC siguió una distribución de Poisson, a pesar de que hubo cierta tendencia a la subdispersión. El tiempo necesario para el recuento de 100 *PCC-R-f* fue alrededor de 2 horas.

Todas las series experimentales probadas tuvieron una pendiente significativa ( $p < 0.05$ ) y una respuesta a la dosis significativa, sin diferencias entre ellas, por lo que se unieron los datos para ajustar la curva dosis respuesta lineal  $Y = c + \alpha \cdot D$ , con los coeficientes  $c = 0.007 \pm 0.005$ ,  $\alpha = 0.088 \pm 0.005$  (Figura 7).



**Figura 7. Curvas dosis – respuesta con radiación gamma para el ensayo *PCC-R-f*, con cuatro series experimentales diferentes: linfocitos 8 horas de reparación (—Δ—), linfocitos 24 horas de reparación (—□—), sangre total 8 horas de reparación (—▽—) y la unión de las cuatro series experimentales (—◊—).**

En el intervalo de 0 a 8 Gy cubierto en publicaciones previas, el mejor ajuste fue con un modelo lineal-cuadrático. Esto no es sorprendente pues se conoce que en la región de las altas dosis, usualmente sin puntos experimentales por debajo de los 5 Gy, la dosis respuesta tiene un mejor ajuste al modelo lineal. Por el contrario, la inclusión de puntos experimentales en las bajas dosis puede interferir en el ajuste lineal o dar resultados similares para ambos ajustes (Romero et al., 2014). Sin embargo, en la región de las altas dosis, donde el término cuadrático no es relevante, el uso del modelo lineal parece ser el más apropiado.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el protocolo de PCC fusión combinado con la visualización y cuantificación rápida de anillos (*PCC-R-f*) resulta ser el método citogenético más expedito (elimina los 2 días de cultivo) publicado hasta el momento para la estimación de altas dosis en accidentes con radiación gamma, en el mismo intervalo de dosis reportado para el ensayo *PCC-R-ch*.

El recuento de anillos después de la tinción con Giemsa en el ensayo PCC fusión introduce varias ventajas en comparación con el recuento de fragmentos en exceso utilizado frecuentemente en la dosimetría biológica.

La primera es que se reduce significativamente la complejidad del recuento de los fragmentos PCC, cuya frecuencia es particularmente elevada después de altas dosis de radiación. Los anillos son reconocidos fácilmente, su frecuencia es menor pero aun suficiente para una adecuada exactitud estadística y por consiguiente el recuento es un proceso rápido.

La segunda ventaja importante es que se resuelve el problema de la cinética de declinación con el tiempo asociada con los fragmentos en exceso ya que la formación de los anillos permanece constante después de 8 horas de incubación en las dos condiciones experimentales probadas: linfocitos aislados y sangre total.

La tercera es la distribución de anillos en las células. Los *PCC-R-f* siguen una distribución de Poisson, como era de esperar para irradiaciones totales uniformes. Esto es consistente con los

hallazgos previos en la región de las bajas dosis, introduciendo la posibilidad de identificar irradiaciones parciales mediante el uso de las herramientas reportadas para el análisis citogenético convencional, por ejemplo la prueba *u* de Papworth [11].

Finalmente, es importante señalar que el ensayo PCC fusión es aplicado solamente en un número limitado de laboratorios en el mundo. Su aplicabilidad para la dosimetría biológica en la respuesta a emergencia en exposición a radiaciones debe estar precedida por la asimilación del ensayo. Puede obtenerse un número suficiente de células inductoras de mitosis para la aplicación del ensayo, manteniendo los cultivos de células CHO en el laboratorio o utilizando las células CHO congeladas [1].

#### 4. CONCLUSIONES

Los trabajos realizados en los últimos años permitieron implementar los ensayos *PCC-R-ch* y *PCC-R-f* en el Servicio de Dosimetría Biológica con sus correspondientes curvas dosis – efecto. Se demostró que con el ensayo *PCC-R-ch* es posible identificar la irradiación parcial, y estimar la fracción inicial de células irradiadas, así como de calcular la dosis que recibió dicha fracción. El elevado índice de proliferación que se obtiene con el ensayo *PCC-R-ch* permite la reducción del tiempo de cultivo, constituyendo esta otra herramienta para mejorar la respuesta de la dosimetría citogenética ante accidentes radiológicos masivos.

#### 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] IAEA, *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. EPR-Biodosimetry*. ed. IAEA, Vienna (2011).

[2] Müller, W.-U., Streffer, C., “Biological indicators for radiation damage”, *Int. J. Radiat. Biol.* 59(4), pp.863-873 (1991).

[3] Gotoh, E., Tanno, Y., Takakura, K., “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), pp.33-40 (1995).

[4] Gotoh, E., Asakawa, Y., “Detection and evaluation of chromosomal aberrations induced by high doses of  $\gamma$  -irradiation using immunogold-silver painting of prematurely condensed chromosomes”, *Int. J. Radiat. Biol.* 70(5), pp.517-520 (1996).

[5] Durante, M., Furusawa, Y., Gotoh, E., “Technical report. A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry”, *Int. J. Radiat. Biol.* 74(4), pp. 457-462 (1998).

[6] Kowalska, A., Srebniak, M., Wawrzkievicz, A., Kamiński, K., “The influence of calyculin A on lymphocytes in vitro”, *J. Appl. Genet*, 44(3), pp.413-418 (2003).

- [7] Kanda, R., Hayata, I., Lloyd, D.C., “Easy biodosimetry for high-dose radiation exposures using drug-induced prematurely condensed chromosomes” *Int. J. Radiat. Biol.* 75(4), pp.441-446 (1999).
- [8] Pantelias, G.E., Maillie, H.D., “A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol”, *Somat. Cell. Genet.* 9, pp.553-47 (1983).
- [9] IAEA, *Technical Reports Series No. 405 (2001) Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment A Manual.* ed. IAEA, Vienna (2001).
- [10] Lamadrid, A.I., Delbos, M., Garcia, O., Voisin, Ph., Roy, L., “PCC-ring induction in human lymphocytes exposed to gamma and neutron irradiation”, *J. Radiat. Res.* 57, pp.1-6 (2007).
- [11] Papworth, D.G., in Appendix to paper by Savage J.R.K. “Sites of radiation-induced chromosome exchanges”, *Curt. Top. Radiat. Res.* 6, pp.129-194 (1970).
- [12] Lamadrid, A.I., González, J.E., Garcia, O., Voisin, P., Roy, L., “Prematurely Condensed Chromosome Rings after Neutron Irradiation of Human Lymphocytes”, *J. Radiat. Res.* 52, pp.531–535 (2011).
- [13] Papworth, D.G., “Curve fitting by maximum-likelihood”, in Appendix to paper by Savage J.R.K., “Radiation-induced chromosomal aberrations in the plant *Tradescantia*: dose response curves”, *Radiat. Bot.* 15, pp.87-140 (1975).
- [14] Romero, I., García, O., Lamadrid, A.I., Gregoire, E., González, J.E., Morales, W., Martin, C., Barquinero, J.F., Voisin, Ph., “Assessment of simulated high-dose partial-body irradiation by PCC-R assay”, *J. Radiat. Res.* 54, pp.863-871 (2013).
- [15] Ainsbury, E.A., Lloyd, D.C., “Dose estimation software for radiation biodosimetry”, *Health Phys.* 98(2), pp.290-295(2010).
- [16] Matsubara, S., Sasaki, M.S., Adachit, T., “Dose – response relationship of lymphocytes chromosome aberrations in locally irradiated persons”, *J. Radiat. Res.* 15, pp.189-196 (1974).
- [17] Dolphin, G.W., “Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods”, *Handling of Radiation Accident (Proc. Int. Symp. Vienna)* ed. IAEA, Vienna, pp.215-224 (1969).
- [18] Lloyd, D.C., Edwards, A.A., Prosser, J.S., et al., “A collaborative exercise on cytogenetic dosimetry for simulated whole and partial body accidental irradiation”, *Mutat. Res.* 179, pp.197-208 (1987).
- [19] Romero, I., Lamadrid, A.I., González J.E., García, O., Voisin, Ph., Roy, L., “Shortening the culture time in cytogenetic dosimetry using PCC-R assay”, *Radiat. Prot. Dosimetry* (online). doi:10.1093/rpd/ncu258 (2014).
- [20] Lamadrid, A. I., Romero, I., Terzoudi, G. I., González, J.E., Pantelias, G., García, O., “Rapid assessment of high-dose radiation exposures through scoring of cell-fusion-induced

premature chromosome condensation and ring chromosomes”, *Mutat. Res.* 757, pp.45-51 (2013).

[21] Bender, M.A., Awa, A., Brooks, A.L., Evans, H.J., Groer, P.G., Littlefield, L.G., Pereira, C., Preston, R.J., Wachholz, B.W., “Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation”, *Mutat. Res.* 196, pp.103–159 (1988).

[22] Prasanna, P.G., Hamel, C.J.C., Escalada, N.D., Duffy, K.L., Blakely, W.F., “Biological dosimetry using human interphase peripheral blood lymphocytes”, *Mil. Med.* 167, pp.10–12 (2002).

[23] Heimers, A., Brede, H.J., Giesen, U., Hoffmann, W., Influence, “Influence of mitotic delay on the results of biological dosimetry for high doses of ionizing radiation”, *Radiat. Environ. Biophys.* 44, pp.211–218 (2005).

[24] Wang, Z.Z., Li, W.J., Zhi, D.J., Jing, X.G., Wei, W., Gao, Q.X., Liu, B., “Biodosimetry estimate for high-LET irradiation”, *Radiat. Environ. Biophys.* 46, pp.229–235 (2007).

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

[26] Lloyd, D.C., Purrott, R.J., Dolphin, G.W., “Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation”, *Phys. Med. Biol.* 18, pp.421–431 (1973).

[27] Duran, A., Barquinero, J.F., Caballón, M.R., et al., “Suitability of FISH Painting Techniques for the Detection of Partial-Body Irradiations for Biological Dosimetry”, *Radiat. Res.* 157(4), pp.461-468 (2002).

[28] Barquinero, J.F., Barrios, L., Caballón, M.R., et al., “Biological dosimetry in stimulated *in vitro* partial irradiations”, *Int. J. Radiat. Biol.* 71(4), pp.435-440 (1997).

[29] Lloyd, D.C., Edwards, A.A., Moquet, J.E., Guerrero-Carbajal, Y.C., “The role of cytogenetics in early triage of radiation casualties”, *Appl. Radiat. Isot.* 52, pp.1107-1112 (2000).