

CURVA DE MICRONÚCLEOS PARA ALTAS DOSIS DE RAYOS-X

Hernández, M.A.¹, Molina, A.K.², Díaz, L.J.³, Pabón, V.M.⁴, Crane, C.⁵, Bermúdez, A.J.⁶

¹⁻⁴ Universidad Distrital Francisco José de Caldas
Licenciatura en Química
Grupo de Investigación Ciencia y Tecnología Nuclear
Bogotá. Colombia

⁵⁻⁶ Instituto Nacional de Salud
Laboratorio de Genética-Crónicas
Bogotá. Colombia

RESUMEN

Los diversos accidentes e incidentes nucleares y/o radiológicos alrededor del mundo, afectan tanto a los trabajadores ocupacionalmente expuestos (TOE) como al público, lo que hace necesario evaluar las diferentes lesiones en el ADN que causa la radiación ionizante. Por esta razón, Colombia necesita instrumentos para determinar los daños biológicos que se puedan presentar; con base a esta necesidad se construyó una curva dosis-respuesta de altas dosis (0,04-0,5) Gy con la técnica de micronúcleos (MN) para cultivos *in vitro* de sangre periférica, previamente irradiada en el acelerador lineal ELEKTA-AXESSE del Centro Oncológico Javeriano, Hospital San Ignacio, Bogotá. Con el programa "Chromosomal Aberration Calculation Software" (CABAS) se diseñó la curva que corresponde a una ecuación lineal cuadrática con $R^2=1$ ($Y = 0,0151074525491 + 0,028474600282D + 0,0750881875D^2$), se comparó con "Graphpad Prism 6" y "Statgraphics", los resultados $n=6$ (0.95) fueron similares.

1. INTRODUCCIÓN

A continuación se hace una descripción breve de los accidentes e incidentes nucleares más relevantes a lo largo de la historia que involucraron altas dosis de exposición. Como consecuencia del accidente de Goiânia-Brasil en 1988, el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) publicó un boletín sobre las causas y consecuencias e incluyó un listado de accidentes radiológicos sucedidos entre 1945-1987 [1], en 1990 un informe del accidente radiológico de San Salvador [2], al igual que un reporte de Chernóbil en 1992, en el cual se explican los dispositivos de seguridad del reactor y los pormenores del suceso [3]; en ese mismo año se hizo un estudio en Cuba a niños procedentes de las áreas afectadas, encontrándose un incremento promedio de cáncer terminal en ellos [4], como complemento al estudio realizado en 1990 por la técnica de MN en niños con afecciones virales después de dicho accidente [5], y en 1998 publicó un documento sobre cómo planificar la respuesta médica en caso de accidentes radiológicos [6].

En 2001 la Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN) de Argentina y la Comisión Chilena de Energía Atómica (CCHEN), escribieron un libro que recopiló los accidentes ocurridos en

¹ matias_101715@hotmail.com; ² adri_vargas20@hotmail.com; ³ lalitag8@hotmail.com; ⁴ vitia01@hotmail.com; ⁵ [ccrane@ins.gov.co](mailto:crcrane@ins.gov.co); ⁶ abermudez@ins.gov.co

América Latina y el Caribe entre enero de 1962 y septiembre del 2000 [7]. El OIEA, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), con relación al accidente de Chernóbil realizaron una serie de encuentros y foros (2003-2006) con el fin de revisar las consecuencias [8-9] e información sobre las dosis recibidas para las personas evacuadas y no evacuadas de la zona del accidente y las que viven de forma permanente en los lugares aledaños [10], posteriormente en Canadá, en el año 2007, se puso a prueba la capacidad de la red de emergencia citogenética (CEN), por medio del ensayo de dicéntricos como dosimetría rápida [11].

En el 2006 el OIEA publicó un documento para concientizar a la población de no cometer los mismos errores que en el accidente de “Three Mile Island” [12]. En 2009 el IRPA (“International Radiation Protection Association”, por sus siglas en Inglés) escribió un documento con las incertidumbres en la estimación de la dosis-efecto en condiciones de emergencia que ocurrieron en Hiroshima y Nagasaki (1945) y en el accidente de Bikini (1954) [13]; por otra parte, el consulado de Hiroshima efectuó el Simposio Internacional de HICARE para explicar los efectos de la radiación en humanos después del accidente de Fukushima [14-15]. En ese mismo año, se recalcó la necesidad de ampliar las curvas existentes de dosis-respuesta en la dosimetría citogenética, debido al potencial aumento de accidentes nucleares [16].

El OIEA (2011-2012) publicó un manual sobre dosimetría citogenética [17] e hizo un estudio con el que comparó el promedio de dicéntricos en personas que viajaron después del accidente de la central nuclear en Fukushima [18]; en Argentina, se analizó la frecuencia de MN encontrados en cultivos *in vitro* de sangre periférica irradiada con fotones gamma de 0,5-4 Gy [19].

Dado que en Colombia se han hecho pocos estudios sobre el control, seguridad y evaluación por dosimetría citogenética para posibles casos de sobre exposición radiológica a altas dosis de rayos-X, y además por carecer de curvas estandarizadas y validadas, se decidió realizar una, en el rango de 0,04-0,5 Gy con la técnica de MN para suplir esta necesidad.

2. METODOLOGÍA

El manual del OIEA “Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies” se utilizó como protocolo modificado por el Instituto Nacional de Salud (INS) de Colombia para este estudio [17] y de acuerdo con el establecido en la estandarización y validación del método [20].

Para la construcción de la curva dosis-respuesta se irradiaron muestras de sangre periférica de 3 mujeres y 3 hombres, con dosis de (0,04-0,05-0,07-0,10-0,20) y 0,30-0,50 (en intervalos de 0,05) Gy, personas sanas, sin exposición a radiaciones ionizantes en los últimos 3 meses; para cada caso se leyeron 1000 células binucleadas (CB) con el propósito de obtener una estadística representativa. Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizaron los programas utilizados fueron CABAS, Microsoft Office Excel 2010, “Graphpad Prism 6” y “Statgraphics Centurion”.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se muestra la estadística respectiva para la construcción de la curva dosis-respuesta a altas dosis de rayos-X, se calculó el nivel de significancia (valor-P) *Tabla 1*, la frecuencia y probabilidad de MN/CB (Y_c), los límites de confianza (0.95) y las pruebas de bondad de ajuste para confirmar el tipo distribución de los datos obtenidos. Se plantearon dos hipótesis antes de la construcción de la misma, las cuales fueron:

H_0 = No es posible construir una curva dosis-respuesta a altas dosis de radiación con la técnica de MN.

H_1 = Es posible construir una curva dosis-respuesta a altas dosis de radiación con la técnica de MN.

Tabla 1. Estadística descriptiva de MN a altas dosis en 6000 células binucleadas

Dosis (Gy)	0,04	0,05	0,07	0,1	0,2
Muestra	MN hallados				
1	16	16	17	20	24
2	16	17	18	20	25
3	16	18	18	19	23
4	16	17	17	20	24
5	16	16	17	19	24
6	16	16	17	19	24
Total MN	96	100	104	117	144
Media, \bar{X}	16	16,667	17,333	19,5	24
Mediana, M	16	16,5	17	19,5	24
Varianza, σ^2	0	0,6667	0,2667	0,3	0,4
Desviación estándar, σ	0	0,8165	0,5164	0,548	0,6325
Dosis (Gy)	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5
Muestra	MN hallados				
1	29	35	38	44	48
2	30	35	38	43	49
3	30	34	38	43	48
4	30	34	38	43	50
5	31	36	37	42	50
6	29	34	37	43	48
Total MN	179	208	226	258	293
Media, \bar{X}	29,833	34,6667	37,6667	43	48,8333
Mediana, M	30	34,5	38	43	48,5
Varianza, σ^2	0,5667	0,6667	0,2667	0,4	0,9667
Desviación estándar, σ	0,7528	0,8165	0,5164	0,6325	0,9832
Valor-P	0,0000				

Como el valor-P (0,000) es menor que 0,05, se acepta la hipótesis alterna, H_1 . En la anterior tabla, se observa que hay un aumento en el total de MN con la dosis, sin embargo, en los primeros puntos (0,04-0,07) Gy, existe una similitud en las lecturas por paciente $\approx 16,5$, posiblemente debido a que las dosis aún son bajas; por lo tanto el daño cromosómico no es considerado como un caso de exposición elevada (≥ 24 MN).

En la *Tabla 2*, para altas dosis se registró una proporción mayor de CB con un solo MN, sin embargo, la frecuencia descendió para CB con múltiples MN (2-4). Se calcularon parámetros previos como la media muestral (μ) y la varianza (σ^2), necesarios para el índice de Papworth hallado posteriormente.

Tabla 2. Frecuencias observadas (MN/CB) y valores de μ , σ^2

MN/CB (Y_c)	Células binucleadas observadas (C_{exp})				
	(C_{exp})/Dosis, Gy				
	0,04	0,05	0,07	0,10	0,20
0	5904	5900	5896	5883	5856
1	89	99	98	113	139
2	7	1	6	3	4
3	0	0	0	1	1
4	0	0	0	0	0
Total células analizadas	6000	6000	6000	6000	6000
μ	0,0160	0,0167	0,0173	0,0195	0,0240
σ^2	0,0159	0,0166	0,0172	0,0199	0,0238
MN/CB (Y_c)	Células Observadas (Exp)				
	(C_{exp})/Dosis, Gy				
	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
0	5821	5792	5774	5742	5707
1	170	206	224	250	282
2	9	2	2	8	7
3	0	0	0		2
4	0	0	0	0	2
Total células analizadas	6000	6000	6000	6000	6000
μ	0,0298	0,0347	0,0377	0,0430	0,0488
σ^2	0,0298	0,0346	0,0376	0,0429	0,0479

Como la finalidad del estudio es la detección de MN, se observa que la probabilidad de aparición de una CB con un solo MN es mayor en comparación con CB con múltiples MN, para dos (orden 10^{-5}), tres (10^{-8}) y cuatro (10^{-11}); también se hallaron CB sin MN ($\approx 0,98$) a pesar de ser altas dosis, posiblemente porque los efectos que se pueden producir son aleatorios y los mecanismos de reparación del ADN se generan de formas distintas, más o menos eficientes en cada organismo. Se recomienda para próximos estudios, cuantificar la

muerte celular que se presenta y construir una curva de supervivencia que permita analizar este factor para cada paciente (Tabla 3).

Tabla 3. Probabilidad de aparición de MN a altas dosis de rayos-X

MN/CB (Y_c)	Probabilidad, P(MN)/Dosis, Gy				
	$C_{exp}/Dosis, Gy$				
	0,04	0,05	0,07	0,10	0,20
0	0,9968	0,9951	0,9938	0,9928	0,9917
1	0,0031	0,0048	0,0061	0,0071	0,0082
2	$4,99 \times 10^{-6}$	$1,16 \times 10^{-5}$	$1,889 \times 10^{-5}$	$2,54 \times 10^{-5}$	$3,44 \times 10^{-5}$
3	$5,27 \times 10^{-9}$	$1,87 \times 10^{-8}$	$3,88 \times 10^{-8}$	$6,09 \times 10^{-8}$	$9,56 \times 10^{-8}$
4	$4,17 \times 10^{-12}$	$2,26296 \times 10^{-11}$	$5,98842 \times 10^{-11}$	$1,0913 \times 10^{-10}$	$1,99271 \times 10^{-10}$

MN/CB Y_c	Probabilidad, P(MN)/Dosis, Gy				
	$C_{exp}/Dosis, Gy$				
	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
0	0,9907	0,9907	0,9902	0,9893	0,9882
1	0,0092	0,0092	0,0097	0,0105	0,0116
2	$4,31 \times 10^{-5}$	$4,3 \times 10^{-5}$	$4,79 \times 10^{-5}$	$5,63 \times 10^{-5}$	$6,912 \times 10^{-5}$
3	$1,34 \times 10^{-7}$	$1,34 \times 10^{-7}$	$1,56 \times 10^{-7}$	2×10^{-7}	$2,72 \times 10^{-7}$
4	$3,1324 \times 10^{-10}$	$3,1324 \times 10^{-10}$	$3,8576 \times 10^{-10}$	$5,3366 \times 10^{-10}$	$8,0738 \times 10^{-10}$

Para determinar el comportamiento que sigue la curva dosis-respuesta, se ajustaron los datos con el programa CABAS, con el que se obtuvo la ecuación lineal cuadrática $Y=0,0151074525491+0,028474600282D+0,0750881875D^2$, con $R^2=1$ (Figura 1).

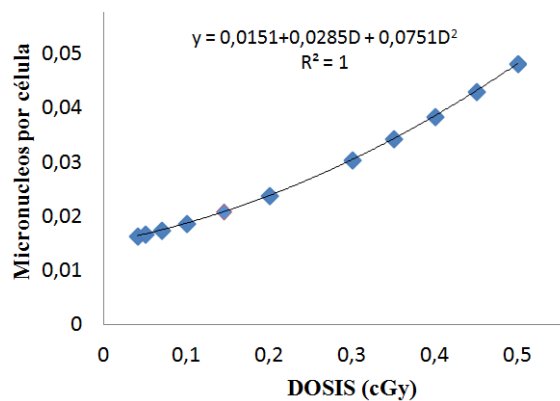


Figura 1. Curva dosis-respuesta a altas dosis de rayos-X

También se comparó su tendencia lineal simple $Y = 0,0123201 + 0,0669101D$ ($R^2=0,9811$) con “Statgraphics”, por otra parte, los límites superior e inferior de confianza se determinaron a partir de la lineal cuadrática, pues presentó un R^2 menos disperso en comparación con la lineal simple, sin embargo, ambas ecuaciones podrían ser útiles para diagnóstico médico.

En la *Tabla 4*, se encuentran los valores que se obtuvieron con el programa “Graphpad Prism 6” para cada uno de los términos de la ecuación lineal cuadrática, los intervalos de confianza y el error estándar, que se corroboraron con los resultados de “Statgraphics” y fueron similares entre ellos.

Tabla 4. Valores de incertidumbre para términos de la ecuación

Ecuación lineal cuadrática			
Valores de ajuste	Error estándar (SE)		0,95 Intervalos de confianza
c	0,01523	0,0005363	0,01396 to 0,01649
α	0,02682	0,005652	0,01346 to 0,04019
β	0,07868	0,01084	0,05305 to 0,1043

En la *Figura 2*, se observó que los intervalos se encuentran más cercanos a la curva ajustada, ya que se evidenció una mayor frecuencia de aparición de MN/CB.

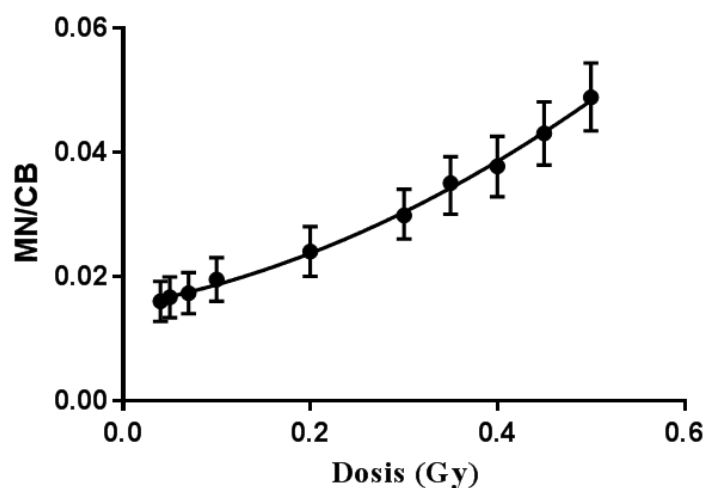


Figura 2. Límites de confianza

En la *Tabla 5*, se encuentran los valores mínimos (**LCI**) y máximos (**LCS**) de los límites de confianza de los datos (0.95), para lo cual se requiere calcular el error promedio (**S**) de cada punto.

Tabla 5. Límites de confianza curva dosis-respuesta

DOSIS (Gy)	S	LCS	MEDIA	LCI
0,04	0,0016	0,0192	0,016	0,0128
0,05	0,0017	0,0199	0,0167	0,0134
0,07	0,0017	0,0206	0,0173	0,014
0,1	0,002	0,023	0,0195	0,016
0,2	0,002	0,028	0,0240	0,02
0,3	0,002	0,034	0,0298	0,026
0,35	0,0024	0,0393	0,035	0,0300
0,4	0,0025	0,0425	0,0377	0,0328
0,45	0,0026	0,0481	0,0430	0,0379
0,5	0,0028	0,0543	0,0488	0,0434

Finalmente, para corroborar el tipo de distribución de los datos, fue necesario hallar los valores del índice de dispersión Papworth (**U**), estos deben encontrarse en el intervalo de $\pm 1,96$, los datos fluctuaron entre -0,0066 y -0,2816, lo cual confirmó la distribución de Poisson. Se calculó Y_{MN} que hace referencia a la relación entre el número de MN por el total de células leídas y la varianza relativa (**VR**) para aplicar la prueba.

Tabla 6. Distribución intrcelular de MN y pruebas de bondad de ajuste a altas dosis

Dosis Gy	No, CB	Total MN	Distribución de MN/CB C_{exp}							VR $\frac{\sigma^2}{Y_{MN}}$	Papworth U
			0	1	2	3	4	σ^2	Y_{MN}		
0,04	6000	0,0164	5904	89	7	0	0	0,0159	0,016	0,9987	-0,0688
0,05	6000	0,0167	5900	99	1	0	0	0,0166	0,0167	0,9988	-0,0066
0,07	6000	0,0175	5896	98	6	0	0	0,0172	0,0173	0,9998	-0,0095
0,10	6000	0,0187	5883	113	3	1	0	0,0199	0,02	0,999	-0,0549
0,20	6000	0,0238	5856	139	4	1	0	0,0238	0,024	0,9948	-0,2816
0,30	6000	0,0304	5821	170	9	0	0	0,0298	0,03	0,996	-0,2196
0,35	6000	0,0343	5792	206	2	0	0	0,0346	0,0347	0,9997	-0,0158
0,40	6000	0,0385	5774	224	2	0	0	0,0376	0,0377	0,9994	-0,0291
0,45	6000	0,0431	5742	250	8	0	0	0,0429	0,043	0,9993	-0,0382
0,50	6000	0,0481	5707	282	7	2	2	0,0479	0,048	0,9997	-0,0114

4. CONCLUSIONES

Fue posible la construcción de la curva a altas dosis de rayos-X con el fin de ser utilizada como control biológico en el caso de un accidente o incidente nuclear.

Es posible determinar la dosis de exposición por medio de la cantidad de MN/CB que se hallen en la muestra, ya que la curva dosis-respuesta presentó tanto un comportamiento lineal como lineal cuadrático ($R^2 = 0,9811$; $0,9951$ respectivamente) con un 95% de confianza. Cabe resaltar, que los datos obedecen a una distribución de Poisson de acuerdo con las pruebas de bondad y ajuste realizadas.

4. REFERENCIAS

1. ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA, “Fuentes radiactivas: Enseñanzas extraídas de Goiânia”, Informe de la OIEA, Boletín **4**, pp. 10-17 (1988).
2. ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA, “El accidente radiológico de San Salvador”, Informe de la OIEA en cooperación con OPS/OMS, STI/PUB/847/ISBN 92 0 3290914 5, (1990).
3. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, “*The Chernobyl Accident: Updating of INSAG-1*”, Safety Report Series/INSAG-7, STI/PUB/913/ISBN 92-0-104692-8, (1992).
4. L. Jova, O. García, M. Valdés, “Evaluación de los riesgos de efectos estocásticos en un grupo de niños procedentes de áreas afectadas por el accidente de Chernobil”, Centro de Protección e Higiene de la Radiaciones, (1992)
5. O. García, A. Lamadrid, J. Manzano, “Células con múltiples micronúcleos, asociadas a enfermedad viral, detectadas durante el estudio de niños relacionados con el accidente de Chernobil”, Centro de Protección e Higiene de la Radiaciones, pp. 102-106 (1990).
6. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, “Planning the Medical Response to Radiological Accidents”, Safety Reports Series No. 4/ISBN 92 0 102598 X, IAEA/WHO, (1998)
7. M. Carregado, L. Trujillo, *Accidentes e Incidentes en el Área Nuclear ocurridos en América Latina y el Caribe. Recopilación Bibliográfica*, Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN)-Comisión Chilena De Energía Atómica (CCHEN), Arreglos Regionales para la Promoción de la Ciencia y Tecnología Nucleares en América Latina (ARCAL), CNEA, ISBN: 987-97059-7-1, Buenos Aires, Argentina (2001)
8. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, “Chernobyl’s Legacy: Health, Environmental and Socio-economic Impacts and Recommendations to the Governments of Belarus, the Russian Federation and Ukraine”, *Report of the Chernobyl Forum: 2003-2005*, second revised version, IAEA/PI/A.87 REV. 2/06-09181, (2006).
9. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, “Chernóbil: la verdadera escala del accidente veinte años después, un informe de las Naciones Unidas da respuestas definitivas y fórmula sugerencias para reparar las vidas dañadas”, The Chernobyl Forum en cooperación con IAEA/WHO/UNDP, (2005).
10. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, “Environmental Consequences of The Chernobyl Accident and their Remediation: Twenty Years of Experience”, Report of the Chernobyl Forum Expert Group “Environment”, *Radiological Assessment Report Series*, (2006).
11. M.S. Miller, C.L. Ferrarotto, S. Vlahovich et al., “Canadian Cytogenetic Emergency Network (CEN) for biological dosimetry following radiological/nuclear accidents”, *Int J Radiat Biol*, vol. **89**, no. 7, pp. 471-477, (2007).
12. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, P. Sandman, “Tell it Like it is: 7 Lessons from TMI”, *Bulletin*, vol. **47**, no. 2, (2006).

13. Nishiwaki, Y. et al., “Uncertainties under Emergency Conditions in Hiroshima and Nagasaki in 1945 and Bikini Accident in 1954”, *IRPA*, Japón, pp. 1-10.
14. E. Rosenblatt, “The Effects of Radiation on the Human Body”, *HICARE*, Consulado de Hiroshima/IAEA, http://www.hicare.jp/en/lecture/pdf/sympo_report/022_026.pdf
15. D. Mohamed, “Deputy Director General of the IAEA”, *HICARE*, Consulado de Hiroshima/IAEA, Japan, http://www.hicare.jp/en/lecture/pdf/sympo_report/056_058.pdf
16. U. Kulka, U. Oestreicher, H. Romm, “Dosisabschätzung nach Überexposition mit ionisierender Strahlung Teil 1: Biologische Dosimetrie”, *UMID: Umwelt und Mensch*, no. 4, pp. 11-17, (2010).
17. INTERNACIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, “Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies”, IAEA-EPR, Austria, (2011).
18. Lee, J. K., Han, E. A., Lee, S. S., Ha, W. H., Barquinero, J. F., Lee, H. R. and Cho, M. S. “Cytogenetic Biodosimetry for Fukushima Travelers After the Nuclear Power Plant Accident: no Evidence of Enhanced Yield of Dicentric”, *J Radiat Res.*, **vol. 53** (6), pp.876– 881 (2012).
19. M. Di Giorgio, M. Ferraro, E. Thomasz, “Use of micronuclei in biological dosimetry with gamma rays: a method for rapid screening in the case of large –scale radiation accidents”. *Comisión Nacional de Energía Atómica*, **vol. 2**, Argentina.
20. Díaz, L. J., Hernández, M. A., Molina, A. K., Crane, C., Pabón, V. M., Bermúdez, A., “Preliminary study of standardization and validation of micronuclei technique to assess the DNA damages caused by the X-Rays”, *XIII International Conference on Medical Physics, Radiobiology and Radiation Protection*, Zurich, Switzerland, 13-14 January (2015)
21. Molina, A.K.2, Díaz, L.J.2, Hernández, M.A. 3, Pabón, V.M.4, Crane, C.5, Bermúdez, A.J. “Evaluación por micronúcleos de daños en ADN con bajas dosis de rayos-X”, *aceptado para presentarlo en el X Congreso Regional Latinoamericano IRPA de Protección y Seguridad Radiológica*, 12-17 abril, Buenos Aires, Argentina (2015)