

EVALUACIÓN POR MICRONÚCLEOS DE DAÑOS EN ADN CON BAJAS DOSIS DE RAYOS-X

Molina, A.K.¹, Díaz, L.J.², Hernández, M.A.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 micronúcleos (MN) son indicadores biológicos para evaluar los daños en el ADN por causa de la radiación ionizante. Esta técnica, al igual que la de aberraciones cromosómicas (AC), se realiza en cultivos "in vitro" de sangre periférica, como complemento de la dosimetría física. Colombia no es ajena al uso de estas herramientas de diagnóstico y por tanto, la estandarización y validación de la técnica, además de la construcción de una curva dosis-respuesta para dosis bajas de rayos-X (0,0-0,03) Gy, es importante para contribuir al mejoramiento en la radioprotección de los trabajadores ocupacionalmente expuestos (TOE), en medicina nuclear y otras áreas de exposición. La curva $Y=0,00355751933153 + 0,533284573075D - 6,1608782797D^2$, sigue un comportamiento lineal cuadrático con $R^2 = 1$, se ajustó por mínimos cuadrados con el programa CABAS, resultados que son comparables con los de Excel, Graphpad Prism 6 y Statgraphics. El índice de Papworth confirma que los datos obedecen a una distribución de Poisson, además se estimaron los límites de confianza superior e inferior, con R^2 (0,9466 y 0,9545) respectivamente. La investigación se pretende continuar con la construcción de la curva hasta 0,5 Gy, para utilizarla en el diagnóstico médico y determinar las dosis de exposición de TOE y pacientes a rayos-X, así como también en el caso de un accidente o incidente nuclear.

1. INTRODUCCIÓN

A continuación se realiza una revisión breve de las investigaciones más sobresalientes en los últimos años en algunos países sobre la técnica de MN. En 1992 investigadores del CIEMAT, España [1], con esta técnica realizaron el estudio de dosimetría biológica para rayos-X, al comparar la frecuencia de aparición de MN respecto a las dosis de radiación. Di Giorgio y colaboradores (Argentina) en 1995 analizaron factores como la edad y fumadores en la aparición espontánea de MN y por radiación inducida de (0,35-4) Gy [2]; en 1998 efectuaron un estudio de MN para la detección del daño radioinducido (0-4) Gy [3]. Para 1997, se realizó el estudio de una curva dosis-respuesta con MN por bloqueo citocinético [4]. En el año 2004, se evaluó la ausencia del daño cromosómico y genotóxico inducido por dosis de radiación administrada en exploraciones gammagráficas; se concluyó que en las pruebas de diagnóstico con radiación ionizante, aumenta la aparición de MN, mientras que en los tratamientos de medicina nuclear, no presenta un aumento significativo [5]; en ese mismo año

¹ adri_vargas20@hotmail.com; ² lalitadigo8@hotmail.com; ³ matias_101715@hotmail.com; ⁴ vitia01@hotmail.com; ⁵ crcrane@ins.gov.co; ⁶ abermudez@ins.gov.co

en Barcelona, se analizó la actividad genotóxica de una fuente de ^{131}I para pacientes con carcinomas de tiroides, se obtuvo una relación lineal entre la frecuencia de aparición de MN y la dosis de radiación ionizante administrada [6].

Posteriormente para el 2006 se llevó a cabo un ensayo de radiosensibilidad individual de sangre periférica, en el rango de 0 a 8 Gy [7]. En el año 2008, se estudió la respuesta a bajas dosis en la inducción *in vivo* de MN y los aductos producidos por acrilamida, ambos presentaron un comportamiento lineal [8]. Para el 2010 se realizó el ensayo de MN como dosímetro biológico para la exposición a la radiación ionizante *in vivo*, se recalcó la importancia de esta técnica por su facilidad en los análisis y por ser más económica que la de AC [9]; en ese mismo año, se efectuó un estudio de dosimetría biológica para la detección de MN en pacientes expuestos a cobaltoterapia en Paraguay, en el cual se concluyó que entre más alejada se encuentra la fuente de irradiación de la muestra, hay una disminución en la frecuencia de aparición [10]. En el año 2011, se estandarizaron y validaron los marcadores citogenéticos para cuantificar la dosis de radiación absorbida, se reconoció que es necesario tener un control biológico de exposición a la radiación ionizante que verifique el monitoreo y los resultados de la dosimetría física [11]. Para el 2013, se evaluaron actividades desarrolladas por el Laboratorio de Dosimetría Biológica de la Autoridad Regulatoria Nuclear de Argentina, se hizo una revisión de las técnicas más apropiadas de acuerdo con la dosis de sobreexposición que se presenta en un paciente o en la población [12]. Finalmente en el 2015, se validó y estandarizó la técnica convencional de MN en Colombia [13].

2. METODOLOGÍA

Para el trabajo experimental y el protocolo de los cultivos, se tomó como guía el manual del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) “Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies”, modificado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS) [14].

En el diseño de la curva dosis-respuesta, se tuvieron en cuenta cada uno de los pacientes estudiados en la estandarización y validación del método (3 hombres-3 mujeres), a quienes se les tomó la muestra de sangre de manera periódica y se irradió con las dosis respectivas; para cada paciente y dosis se contaron 1000 células binucleadas (CB) incluidos los blancos, con el fin de tener una estadística representativa. Para realizar la curva a bajas dosis se establecieron los puntos 0,0 a 0,0125 Gy (intervalos de 0,025) y (0,0175-0,02-0,0225-0,0275-0,03) Gy.

Para el análisis estadístico se usaron varios programas que confirmaron la veracidad de los datos, como “Chromosomal Aberration Calculation Software” (CABAS), Microsoft Office Excel 2010, “Graphpad Prism 6” y “Stat Graphics Centurion”.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Posterior a la validación y estandarización de la técnica y entrenamiento de los analistas, se construyó la curva dosis-respuesta para bajas dosis. A continuación se presenta el análisis estadístico respectivo.

En la *Tabla 1*, se puede observar la cantidad de MN en 6000 células por dosis de radiación, se muestra el aumento de MN con la dosis, aunque se encontraron valores muy cercanos entre las frecuencias por punto de dosis. La estadística se realizó sobre el total de células puesto que la técnica fue validada y estandarizada previamente. Se puede observar que de acuerdo con el análisis de regresión, el valor-P es menor que 0,05, lo que quiere decir que la relación tanto lineal como cuadrática entre los MN hallados y la dosis, están dentro de los límites de confianza del 95% y por tanto, la curva podría ser útil para diagnóstico médico.

Tabla 1. Estadística descriptiva de MN hallados a bajas dosis de rayos-X en 6000 CB

Dosis (Gy)		0	0,0025	0,005	0,0075	0,01	0,0125
Muestra		MN hallados					
M	1	3	5	6	8	9	11
	2	3	4	7	7	10	10
	3	4	5	7	7	8	9
H	4	4	5	5	7	9	10
	5	2	6	6	8	10	10
	6	3	5	7	7	9	9
Total MN		19	30	38	44	55	59
Media, \bar{X}		3,1667	5	6,3333	7,333	9,1667	9,8333
Mediana, M		3	5	6,5	7	9	10
Varianza, σ^2		0,5667	0,4	0,6667	0,267	0,5667	0,5667
Desviación estándar, σ		0,7528	0,6325	0,8165	0,516	0,7528	0,7528
Dosis (Gy)		0,0175	0,02	0,0225	0,0275	0,03	
Muestra		MN hallados					
M	1	11	11	12	13	16	
	2	10	10	12	12	16	
	3	11	11	12	13	15	
H	4	10	11	11	13	16	
	5	10	12	12	12	16	
	6	10	10	10	14	15	
Total MN		62	65	69	77	94	
Media, \bar{X}		10,3333	10,8333	11,5	12,8333	15,6667	
Mediana, M		10	11	12	13	16	
Varianza, σ^2		0,2667	0,5667	0,7	0,5667	0,2667	
Desviación estándar, σ		0,5164	0,7528	0,8367	0,7528	0,5164	
Valor-P		0,0000					

M= Mujer; H= Hombre

Antes de ajustar la curva dosis-respuesta se realizó el análisis estadístico de la distribución de los datos, teniendo en cuenta como variables discretas las dosis y la frecuencia de aparición d

e MN, ya que toman un valor finito. En la *Tabla 2* se muestra la distribución de MN/CB (Y_c), a los cuales se les calculó la media muestral (μ) y la varianza (σ^2), necesarios para determinar si los datos obedecen a una distribución de Poisson. Se observó que a pesar de diferentes valores de dosis, pero todos muy bajos, es más usual encontrar CB con cero MN y por tanto es más frecuente hallar CB con más de un MN.

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

MN/CB (Y_c)	Células binucleadas observadas (C_{exp})					
	$C_{exp}/Dosis, Gy$					
	0,0	0,0025	0,005	0,0075	0,01	0,0125
0	5981	5971	5963	5957	5936	5950
1	19	28	36	42	60	48
2	0	1	1	1	3	0
3	0	0	0	0	1	1
4	0	0	0	0	0	1
Total CB analizadas	6000	6000	6000	6000	6000	6000
μ	0,0032	0,0048	0,0062	0,0072	0,0083	0,0093
σ^2	0,00318	0,0049	0,0061	0,00717	0,00829	0,00928

MN/CB (Y_c)	Células binucleadas observadas (C_{exp})				
	$C_{exp}/Dosis, Gy$				
	0,0175	0,02	0,0225	0,0275	0,03
0	5944	5944	5941	5929	5906
1	54	50	53	66	94
2	1	6	6	4	0
3	1	0	0	1	0
4	0	0	0	0	0
Total CB analizadas	6000	6000	6000	6000	6000
μ	0,0093	0,0098	0,0107	0,0118	0,0157
σ^2	0,009299	0,00979	0,010689	0,01178	0,01568

Como se observa en la *Tabla 3*, la probabilidad de formación de un MN en una CB es muy baja (orden de 10^{-3}), sin embargo, disminuye y se hace cada vez más pequeña para encontrar CB con múltiples MN 2,3,4 (orden de 10^{-6} a 10^{-12}), por lo tanto, la mayor probabilidad ($\approx 0,99$) es no encontrar daño cromosómico alguno (cero MN); pero es necesario recalcar que aun con dosis bajas de radiación, se pueden producir efectos biológicos significativos y no se debe despreciar el daño que se pueda producir.

Para obtener la ecuación lineal cuadrática ajustada, se realizó la corrección respectiva mediante el programa CABAS, aunque éste sea utilizado con mayor frecuencia para dicéntricos, es p

osible emplearlo para MN debido a que estos son considerados también como una aberración cromosómica inestable [15].

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

MN/CB (Y _c)	Probabilidad, P(MN)/Dosis, Gy					
	C _{exp} /Dosis, Gy					
	0,0	0,0025	0,005	0,0075	0,01	0,0125
0	0,9968	0,9952	0,9939	0,9929	0,9917	0,9907
1	3,2x10 ⁻³	4,81x10 ⁻³	6,12x10 ⁻³	7,11x10 ⁻³	8,3x10 ⁻³	9,24x10 ⁻³
2	5x10 ⁻⁶	1,16x10 ⁻⁵	1,9x10 ⁻⁵	2,54x10 ⁻⁵	3,44x10 ⁻⁵	4,31x10 ⁻⁵
3	5,28x10 ⁻⁹	1,9x10 ⁻⁸	3,9x10 ⁻⁸	6,1x10 ⁻⁸	9,56x10 ⁻⁸	1,34x10 ⁻⁷
4	4,17x10 ⁻¹²	2,26x10 ⁻¹¹	6x10 ⁻¹¹	1,1x10 ⁻¹⁰	2x10 ⁻¹⁰	3,13x10 ⁻¹⁰

MN/CB (Y _c)	Probabilidad, P(MN)/Dosis, Gy					
	C _{exp} /Dosis, Gy					
	0,0175	0,02	0,0225	0,0275	0,03	
0	0,9907	0,9902	0,9894	0,9882	0,9845	
1	9,24x10 ⁻³	9,73x10 ⁻³	1,06x10 ⁻²	1,17x10 ⁻²	1,54x10 ⁻²	
2	4,31x10 ⁻⁵	4,78x10 ⁻⁵	5,63x10 ⁻⁵	6,91x10 ⁻⁵	1,21x10 ⁻⁴	
3	1,34x10 ⁻⁷	1,57x10 ⁻⁷	2x10 ⁻⁷	2,73x10 ⁻⁷	6,31x10 ⁻⁷	
4	3,13x10 ⁻¹⁰	3,86x10 ⁻¹⁰	5,33x10 ⁻¹⁰	8,1x10 ⁻¹⁰	2,47x10 ⁻⁹	

Con base en el tratamiento estadístico de los datos, se puede decir que la técnica de MN es apropiada para la detección de los mismos, incluso a pesar de que por punto de dosis en el momento de las respectivas lecturas, no se encontraron diferencias significativas en el aumento de la frecuencia. De acuerdo con la forma de la curva (*figura 1*), existe la posibilidad de que los efectos estocásticos en cadena sean en menor proporción, disminuyendo así la cantidad de MN, por lo que el sistema de reparación del ADN podría actuar de forma más eficiente. Cabe resaltar que la relación entre la dosis de radiación y la frecuencia de MN, además de presentar un comportamiento lineal cuadrático, también tiende a ser lineal, $Y = 0,00439381 + 0,347546 D$ ($R^2 = 0,9793$; "Statgraphics"), reafirma lo que reporta la literatura, que a bajas dosis la tendencia podría ser lineal [16].

La ecuación lineal cuadrática que se obtuvo por el programa CABAS y la curva correspondiente son:

$$Y = 0,00355751933153 + 0,533284573075 D - 6,1608782797 D^2$$

Para realizar la curva de intervalos de confianza fue necesario calcular el error promedio (S) de cada punto de dosis, para determinar el límite de confianza superior (LS) e inferior (LI), como se muestra en la *Tabla 4*.

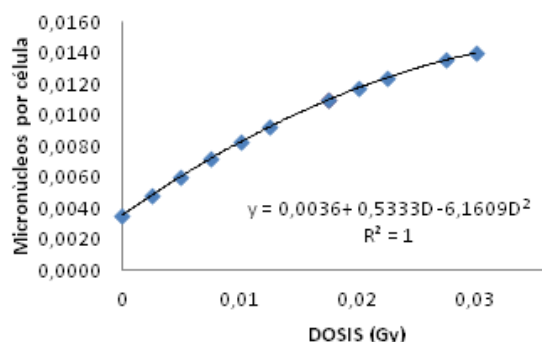


Figura 1. Curva dosis-respuesta a bajas dosis de rayos-X

Tabla 4. Límites de confianza curva dosis-respuesta

DOSIS (cGy)	S	MN	LI	LS
0,0000	0,0007	0,0036	0,0018	0,0046
0,0025	0,0009	0,0049	0,0032	0,0068
0,0050	0,0010	0,0061	0,0043	0,0083
0,0075	0,0011	0,0072	0,0052	0,0095
0,0100	0,0012	0,0083	0,0070	0,0120
0,0125	0,0013	0,0093	0,0070	0,0120
0,0175	0,0013	0,0110	0,0078	0,0129
0,0200	0,0013	0,0118	0,0082	0,0135
0,0225	0,0014	0,0124	0,0088	0,0142
0,0275	0,0015	0,0136	0,0100	0,0157
0,0300	0,0016	0,0140	0,0122	0,0188

En la *Figura 2*, se muestran los límites superiores e inferiores de la curva (0,95). Los datos de incertidumbre para cada uno de los términos de la ecuación (*Tabla 5*), se obtuvieron con el programa “Graphpad Prism 6”, que son comparables con los del programa “Statgraphics”.

Para confirmar el tipo de distribución se aplican las pruebas de bondad de ajuste, como la varianza relativa (VR), que es la relación entre la varianza y el rendimiento de MN, y el índice de dispersión de Papworth (U), que compara las diferencias entre la varianza y la frecuencia de MN por célula.

Tabla 5. Valores de incertidumbre de los términos de la ecuación

Ecuación lineal cuadrática			
Terminos ecuación	Valor ajuste	Error estándar (SE)	Intervalos de confianza (0,95)
c	0,003600	$2,051 \times 10^{-5}$	0,003553 to 0,003647
α	0,5306	0,003324	0,5229 to 0,5382
β	-6,112	0,1070	-6,359 to -5,865

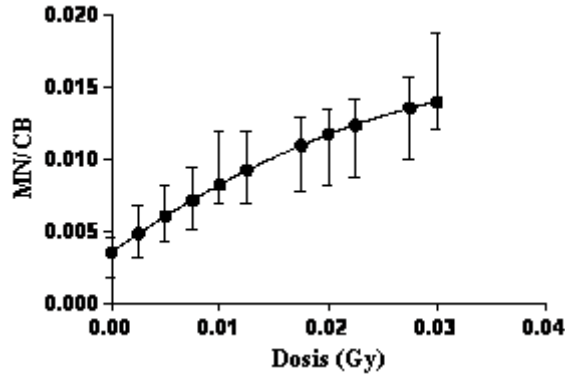


Figura 2. Intervalos de confianza

De acuerdo con los valores U calculados, se corroboró que los datos obedecen a una distribución de Poisson (Tabla 6), debido a que estos oscilan entre -0,0059 a 1,14 y se encuentran dentro del intervalo que establece la prueba de $\pm 1,96$.

Tabla 6. Pruebas de bondad de ajuste

Dosis Gy	No CB	Total MN	Distribución de MN/CB (C_{exp})						VR	Papworth	
			0	1	2	3	4	σ^2			Y_{MN}
0,0000	6000	0,0036	5981	19	0	0	0	0,0032	0,0032	0,9965	0,1933
0,0025	6000	0,0049	5971	28	1	0	0	0,0049	0,0048	1,0208	1,1409
0,005	6000	0,0061	5963	36	1	0	0	0,0061	0,0062	0,9983	-0,0895
0,0075	6000	0,0072	5957	42	1	0	0	0,0071	0,0072	0,9958	-0,2308
0,0100	6000	0,0083	5950	48	0	1	1	0,0082	0,0083	0,9988	-0,0666
0,0125	6000	0,0093	5944	54	1	1	0	0,0092	0,0093	0,9979	-0,1188
0,0175	6000	0,0110	5944	50	6	0	0	0,0092	0,0093	0,9999	-0,0059
0,0200	6000	0,0118	5941	53	6	0	0	0,0097	0,0098	0,9989	-0,0564
0,0225	6000	0,0124	5936	60	3	1	0	0,0106	0,0107	0,9989	-0,0567
0,0275	6000	0,0136	5929	66	4	1	0	0,0117	0,0118	0,9983	-0,0935
0,0300	6000	0,0140	5906	94	0	0	0	0,0156	0,0157	0,9987	-0,0698

Para obtener la dosis (D_{Gy}), se puede emplear la solución de la ecuación cuadrática, así como también la curva dosis-respuesta al interpolar la frecuencia de MN/CB encontrados en la muestra (Figura 3). Por ejemplo, para una frecuencia de 0,01100323, el resultado de la dosis es de 0,01736 Gy

$$D = \frac{-\beta \pm \sqrt{\beta^2 - 4\alpha c}}{2\alpha} \quad (1)$$

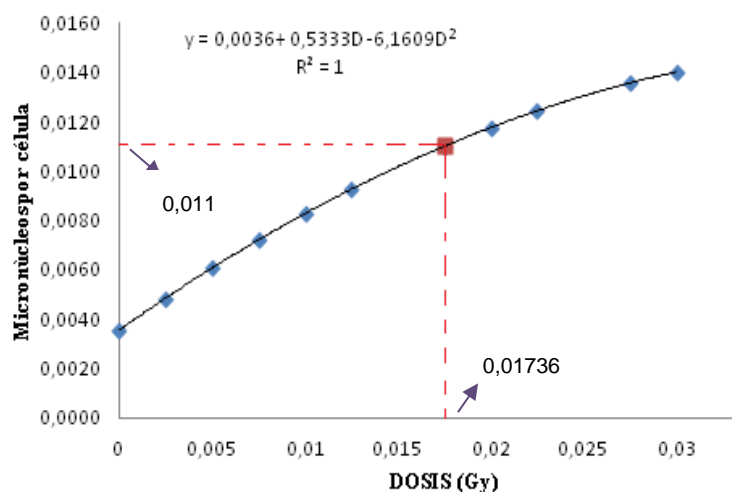


Figura 3. Interpolación de la curva para hallar la dosis

4. CONCLUSIONES

Para el caso de una exposición a bajas dosis de rayos-X, el posible daño cromosómico que se puede producir es muy bajo en comparación con la cantidad de CB encontradas sin MN, debido a que posiblemente los sistemas de reparación del ADN pueden actuar de manera rápida y eficiente.

Los datos obtenidos en este estudio presentan tanto una tendencia lineal como lineal cuadrática, por tanto la curva dosis-respuesta puede ser utilizada a criterio del investigador para hallar la dosis del paciente, ya que ambas poseen un alto coeficiente de correlación 0.98 y 0.99 respectivamente, además cualquier resultado que se encuentre en el intervalo tiene una confiabilidad del 95%.

De acuerdo con las pruebas de bondad de ajuste, los datos obedecen a una distribución de Poisson, debido a que los valores U se encuentran en el intervalo de la prueba $\pm 1,96$.

Finalmente se recomienda trabajar el ensayo de MN a bajas dosis con la técnica de Fish (MN-centrómeros), de esta manera quizá se podría obtener una mayor diferencia y claridad en la frecuencia de MN encontrados por punto de dosis, ya que la literatura afirma que este método es más sensible.

4. REFERENCIAS

1. Gómez Sánchez, E., Navlet Armenta, J., Silva Mato, A., "Dosimetría biológica de rayos-X mediante el estudio de micronúcleos", *CIEMAT*, (1992)
2. Di Giorgio, M., Nasazzi, N., Heredia, M. L., "Influencia de la edad y habito de fumar sobre las frecuencias espontánea y radioinducida de micronúcleos en linfocitos humanos," *V Congreso Argentino de Radioprotección*, Santa Fé, 6-8 septiembre de 1995, **vol. 8**, (13) (1995)

3. Di Giorgio, M., Nasazzi, N. B. y Taja, M. R., "Micronúcleos: sensibilidad para la detección de daño radioinducido," *4º Congreso Regional de Seguridad Radiológica Nuclear*, La Habana, Cuba, 19-23 octubre de 1998, pp. 1-5 (1998)
4. Paul, S. F., Venkatachalam, P., Jeevanram, R. K., "Analysis of radiation dose-response curve obtained with cytokinesis block micronucleus assay", *Nucl Med Biol*, **vol. 24**, (4), pp. 413-416 (1997)
5. Navarro Fernández, J. L., Alcaraz Baños, M., Gómez Moraga, A., Vicente Ortega, V., Canteras Jordana, M., "Ausencia de daño cromosómico y genotóxico inducido por la dosis de radiación administrada en las exploraciones gammagráficas" *Medicina Nuclear e Imagen Nuclear*, **vol. 23**, (3) (2004)
6. Navarro Fernández, J. L., Alcaraz Baños, M., Gómez Moraga, A., Vicente Ortega, V., Canteras Jordana, M., "Actividad genotóxica de la terapia con I131 en pacientes tratados por carcinomas de tiroides" *Oncología (Barc.)*, **vol. 27**, (1) (2004)
7. Güerci Antola, A. M., Zúñiga Venegas, L. A., Dauder, R. M., "El valor predictivo del ensayo cometa en la evaluación de la radiosensibilidad individual en sangre periférica", *Theoria*, **vol. 15**, (2), pp. 41-52 (2006)
8. Zeiger, E., Recio, L., Fennell, T. R., Haseman, J. K., Snyder, R. W., Friedman, M., "Investigation of the Low-Dose Response in the In Vivo Induction of Micronuclei and Adducts by Acrylamide", *Toxicol. Sci.*, **vol. 107**, (1), pp. 247-257 (2008)
9. Vral, A., Fenech, M., Thierens, H., "The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure", *Mutagenesis*, **vol. 26**, (1), pp. 11-17 (2010)
10. Gómez Grance et al., "Dosimetría biológica basada en la detección de micronucleos en pacientes expuestos a cobaltoterapia en Paraguay", *Resportes Científicos de la FACEN*, **vol. 1**, (1), pp. 80-89 (2010)
11. Perumal, V., Paul, S., Kaur, H., Jeevanram, R. K., "Standardisation and validation of cytogenetic markers to quantify radiation absorbed dose", *Defence Science*, **vol. 61**, (2), pp. 125-132 (2011)
12. Radl, A., Sapienza, C. E., Taja, M. R., Bubniak, R., Deminge, M., Di Giorgio, M., "Actividades desarrolladas por el laboratorio de dosimetría biológica de la autoridad regulatoria nuclear de argentina", *IX Latin American IRPA Regional Congress on Radiation Protection and Safety*, Rio de Janeiro, Brasil, 15-19 abril (2013)
13. 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)
14. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA), "Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies", IAEA-EPR, Austria, (2011).
15. López Díaz, B., Mercado Sáenz, S., Ruiz Gómez, M. J., "Dosimetría Biológica: Principios y Utilidad". *Radiobiología*, **vol. 8**, pp. 186-189 (2008)
16. Guerrero Carbajal, C., Breña Valle, M., "Curva de calibración para establecer dosis de exposición a radiación gamma de ⁶⁰Co". *NCL Collections*, pp. 1-5 (s.a)