

Trabajos Originales

Análisis de aberraciones cromosómicas para dosimetría citogenética

Cecilia Crane, Héctor H. Zamora, Antonio J. Bermúdez, Héctor G. Barreto, Campo Elias Pardo, Jaime J. Ahumada

Se realizó una curva de calibración mediante el estudio *in vitro* sobre 20 muestras de sangre de individuos con características específicas, irradiadas con diferentes dosis de radiación X y gamma, entre 50 y 500 cGy con intervalos de 50 cGy entre cada dosis. Se efectuaron cultivos de linfocitos con técnicas convencionales de citogenética humana. De las células obtenidas se cuantificaron las aberraciones cromosómicas en un total de 500 metafases por dosis de radiación, buscando garantizar una base sólida de diagnóstico en pacientes expuestos a la radiación.

Con base en estas curvas de control se interpretaron los resultados de muestras de sangre de individuos laboralmente expuestos con el fin de determinar el daño biológico que habían sufrido y una aproximación a la dosis de exposición, dando inicio a un programa de investigación y prestación de servicios en el campo.

INTRODUCCION

Con el incremento de la utilización de fuentes radiactivas en los campos de la salud, la industria, la investigación y la enseñanza, ha aumentado el número de personas que laboran con ellas y que pueden ser afectadas de no emplear los procedimientos, los blindajes y las recomendaciones ade-

cuados. Por esto se ha despertado un especial interés en el efecto de las radiaciones ionizantes y la necesidad del empleo de métodos eficientes para la medición del riesgo laboral y del manejo médico del trabajador ocupacionalmente expuesto, más allá de la adecuación de las instalaciones, calibración de los equipos, adopción de procedimientos seguros y de la dosimetría física (1).

En este estudio se obtuvieron curvas de dosis-respuesta por exposición a radiación X y gamma, utilizando técnicas citogenéticas "in vitro", con individuos normales como control y se hizo el cálculo de dosis "in vivo" para personas irradiadas, con el propósito de iniciar un programa de monitorización, diagnóstico y tratamiento (2).

En Colombia, los estudios de evaluación biológica por técnicas citogenéticas, después de sobreexposición a radiaciones ionizantes, son prácticamente desconocidos a pesar del creciente aumento de la población expuesta. Este trabajo servirá para establecer parámetros confiables en la evaluación del daño genético de individuos que hayan estado laboralmente expuestos a radiaciones ionizantes, lo cual puede ser de significativa utilidad en medicina ocupacional, en el manejo de accidentes y en problemas de carácter laboral, como argumento legal (3).

MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Salud (INS) y el Instituto de Ciencias Nucleares y Energías Alternativas (INEA). Elaborando las curvas de calibración sobre diez individuos de ambos sexos, entre 20 y 40 años, que no habían sido sometidos a radiaciones, no trabajaban con fuentes radiactivas, no vivían cerca

Dra. Cecilia Crane U.: BiólogaMSc, Genética, Instituto Nacional de Salud (INS); Dr. Héctor H. Zamora C.: Medicina Nuclear Jefe DPRSN, Instituto Nacional de Ciencias Nucleares y Energías Alternativas (INEA); Dr. Antonio J. Bermúdez: Genética, Instituto Nacional de Salud (INS); Dr. Héctor G. Barreto O.: Físico, MSc Radioprotección, INEA; Dr. Campo Elias Pardo T.: Ing. Quí., MSc Estadística, INEA; Dr. Jaime J. Ahumada B.: Medicina Nuclear, Ex director General INEA.

Solicitud de Separatas a la Dra. Crane.

a zonas de riesgo y no tenían antecedentes de enfermedad importante, drogadicción, alcoholismo o tabaco (1).

Se tomaron aproximadamente 20 mL de sangre periférica del miembro superior, en una jeringa previamente heparinizada. La muestra se dividió en diez alícuotas de 2 mL cada una, observando las condiciones de asepsia necesarias para optimizar los cultivos.

A estas muestras se les administró radiación X y gamma de manera individual, en un rango de 50 a 500 cGy (rads). Para la radiación gamma se utilizó una fuente de ^{60}Co (Equipo El Dorado G. AECL) en un tamaño de campo de 16 x 18 cm, a una distancia fuente-muestra de 80 cm, cuyo rendimiento para la primera irradiación fue de 66.44 cGy por minuto. En la irradiación de las demás muestras se conservaron las condiciones geométricas determinando el rendimiento de la fuente en cada caso. Para radiación X, se empleó un equipo Phillips modelo MCN 321-, aplicando los siguientes parámetros: distancia foco-muestra de 100 cm, kilovoltaje aplicado de 135 kVp (kilovoltios pico), corriente de tubo de 10 mA, y una filtración agregada de 0.3 mm de Cu +1.0 mm de Al; para estas condiciones la energía equivalente de los fotones X corresponde a 58 KeV, con un rendimiento de 5.5 cGy por minuto.

Se utilizó para los cultivos medio esencial mínimo (MEM), a un pH de 7.2. A este medio se le adicionaron antibióticos (penicilina-estrep-tomicina) para evitar la contaminación. Cada muestra se sembró por duplicado, en botellas que contenían 5 mL de medio suplementado con SFB, con la adición de 15 a 18 gotas de sangre completa y heparinizada en cada botella.

Para proporcionar al cultivo todos los nutrientes necesarios y lograr un óptimo crecimiento celular, se utilizó suero fetal de bovino al 20%. La estimulación en la división y proliferación de los linfocitos se logró, mediante la adición de phitohemaglutinina P. La temperatura de incubación fue aproximadamente de $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, con especial atención a la termoestabilidad para evitar la introducción de modificaciones inde-seables.

La recolección se inició mediante la detención de la mitosis a las 72 horas de iniciado el cultivo, adicionando colchicina a una concentración de 0.1 mL de solución de uso diario, 0.016%, evitando dosis celulares que pudieran generar toxicidad. Posteriormente se utilizó una solución de cloruro de potasio al 0.075M, como solución hipotónica.

Se utilizó solución fijadora (Carnoy), en proporción de 3:1 metanol-ácido acético, haciendo cuatro cambios con previas centrifugaciones a diferentes tiempos de fijación. Dos láminas del cultivo anterior se colorearon directa e independientemente del tiempo de goteo durante 7 minutos con: 4.6 mL de agua destilada, 0.2 mL de buffer Giemsa pH = 6.8 y 0.2 mL de colorante Giemsa recién filtrado. Posteriormente se procedió al montaje permanente de las láminas con Permout (4).

Se analizaron 50 metafases, por individuo de cada dosis de radiación, en coloración homogénea de Giemsa y se tomaron fotos de las metafases representativas.

El análisis de las metafases se hizo mediante conteo cromosómico de: anillos, fragmentos acéntricos, cromosomas dicéntricos, minidiplo-cromosomas (MDC), figuras trirradiales, poliploidias, rupturas, fragilidades y otras anomalías (Tablas 1 y 2).

Obtenidos los datos para cada dosis, se hizo el análisis de regresión con el método de mínimos cuadrados repesado, como lo aconseja el método de Merkle para la elaboración de curvas de calibración en dosimetría citogenética, ajustado al modelo (5):

$$Y = a + bD + cD^2 \quad (1)$$

Donde Y = número de aberraciones dicéntricas

D = dosis administrada

a = fondo natural de aberraciones

b y c = coeficientes

Los resultados de las muestras con irradiación gamma y X se ajustaron con sus respectivos intervalos de confianza a 95%, siguiendo el procedimiento sugerido por el Organismo Internacional de Energía Atómica (6).

Tabla 1. Recopilación de las anomalías cromosómicas obtenidas de cultivos de linfocitos *in vitro* a diferentes dosis de radiación gamma (número de observaciones directas al microscopio).

Dosis	Anillos	Fragmentos Acéntricos	Cromosomas Dicéntricos	Poliploidias	MDC	Ruptura	Fragilidad	Trirradial	No. total Metafases Analizadas
0	2	2	2	5	0	5	5	0	1000
50	3	11	31	11	1	5	3	0	500
100	7	36	59	18	3	17	8	0	500
150	78	152	81	30	62	13	10	1	500
200	30	113	73	30	16	17	8	0	500
250	50	129	104	65	568	25	20	1	500
300	33	155	84	32	29	11	2	3	500
350	22	63	121	16	19	32	14	1	500
400	55	272	152	64	84	9	9	0	500
450	69	237	192	85	77	16	7	1	500
500	98	283	196	108	176	25	13	1	500

Tabla 2. Recopilación de las anomalías cromosómicas encontradas en cultivos de linfocitos *in vitro* a diferentes dosis de radiación X (número de observaciones directas al microscopio)

Dosis	Anillos	Fragmentos Acéntricos	Cromosomas Dicéntricos	Poliploidias	MDC	Ruptura	Fragilidad	Trirradial	No. total Metafases Analizadas
0	2	2	2	5	0	5	5	0	1000
50	17	29	17	18	6	3	0	0	500
100	9	75	56	16	5	10	4	0	500
150	24	85	47	31	17	6	0	0	500
200	35	141	97	40	41	7	3	1	500
250	46	273	166	39	56	3	1	0	500
300	118	598	392	172	220	0	1	1	500
350	162	789	420	175	126	2	1	1	500
410	118	420	248	59	112	3	4	0	500
450	142	572	287	88	144	3	2	0	500
500	209	726	435	212	195	0	0	1	500

Se seleccionaron 10 individuos con dosis de radiación gamma y 10 con dosis significativas de radiación X, todos entre los 20 y 40 años, para comparar con las curvas control correspondientes, previamente elaboradas. Todos estos individuos tenían evaluación positiva por dosimetría de película en el registro de seguimiento del INEA.

Se tomaron 2 mL de sangre de los individuos seleccionados y se procedió con la misma metodología practicada a las curvas patrón, leyendo un total de 100 metafases para cada muestra, además

se realizó una monitoria de las instalaciones donde laboraban las personas estudiadas, con el fin de conocer las condiciones de las mismas y los procedimientos.

RESULTADOS

En el estudio *in vitro* se analizaron 1.000 metafases para el control de negativos; y para los positivos con radiación X y gamma, en dosis de radiación de 50 a 500 cGy, con intervalos de 50 cGy, se estudiaron un total de 500 metafases por dosis.

De las muestras sin irradiar, se observó 98.5%



Figura 1. Metafase normal de un individuo control negativo

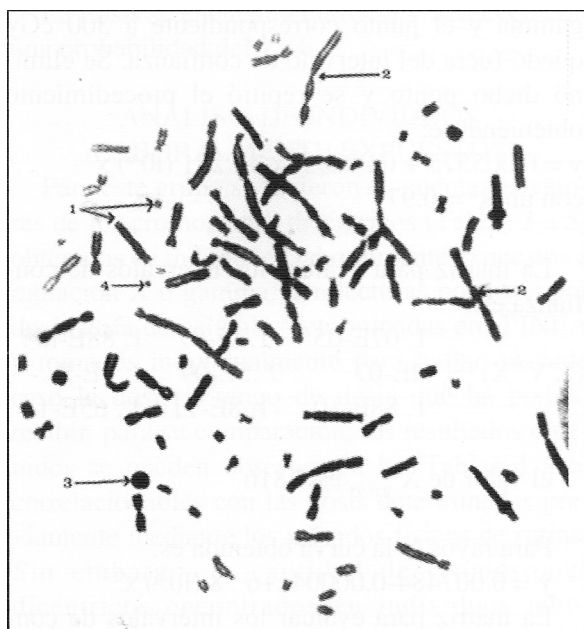


Figura 2. Metafase encontrada en 500 cGy gamma, con múltiples anomalías cromosómicas, donde se pueden observar:

- 1- Fragmentos acéntricos
- 2- Cromosomas dicéntricos
- 3- Anillos
- 4- Minidiplocromosomas.

de metafases normales (Figura 1), y el 1.5% de mitosis con diferentes anomalías cromosómicas (Tablas 1 y 2), cuyos datos corresponden con los valores normales encontrados en la población general. En estudios de personas sanas entre 18 y 45

años, de ambos sexos, se encontraron aberraciones cromosómicas con frecuencias entre 1 y 6 % por célula (rompimientos cromatídicos, fragmentos, dicéntricos, y otras anomalías), con un promedio de 0.88 % aberraciones por persona; éste puede considerarse como el valor espontáneo de la frecuencia de aberraciones en la población normal, y sirve como base comparativa para la evaluación del paciente ocupacionalmente expuesto (7).

De los controles positivos irradiados con rayos gamma, sobre cada dosis se analizaron 500 metafases, encontrándose los resultados descritos en la Tabla 1, con valores hasta la dosis de 300 cGy estadísticamente significativos para el ajuste de las curvas por permanecer dentro del límite de confianza.

Las muestras irradiadas con rayos gamma desde 300 hasta los 400 cGy se encontraron estadísticamente fuera del límite de confianza. Algunas de las anomalías observadas a estas dosis de radiación se aprecian en la Figura 2.

Para las muestras tratadas con radiación X a dosis desde los 50 hasta los 500 cGy, se encontraron las anomalías descritas en la Tabla 2 (Figura 3) en rangos significativos estadísticamente para el estudio.

Elaboración de las curvas control. El número de aberraciones inducidas por radiación en células biológicas no sigue una distribución normal, sino que se aproxima a una distribución de Poisson. Bajo el supuesto de distribución de Poisson un método apropiado para estimar los coeficientes de una ecuación de regresión es el de "mínimos cuadrados pesados" realizado iterativamente y conocido como "mínimos cuadrados repesados".

Sea:

X_i : dosis a un nivel de dosis i -ésimo, $i = 1, \dots, N$

n_i : número de células observadas al i -ésimo nivel de dosis

y_i : promedio del número de aberraciones por célula $y_i = r_i / n_i$

$\lambda_i = E[y_i]$ valor "verdadero" del número de aberraciones/célula.

β_j : j -ésimo parámetro del modelo de respuesta a la dosis, $j = 0, 1, 2$



Figura 3. Metafase obtenida a 500 cGy X *in vitro* a- Cromosomas dicéntricos
b- Minidiplocromosomas
c- Anillos
d- Cromosomas tricéntricos

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \beta_2 x_i^2$$

Se presume que el número de aberraciones sigue una distribución de Poisson con la medida (μ) igual a la varianza = $\lambda_i n_i$. Por lo tanto la varianza de y_i es λ_i/n_i .

Los λ_i son desconocidos y una primera estimación de la varianza de y_i es:

$$V_0(y_i) = y_i/n_i$$

el subíndice 0, a la izquierda indica que la cantidad es una estimación premilinar.

Una primera estimación de los coeficientes $1b_1$, $1b_2$ se obtiene mediante regresión por el método de los mínimos cuadrados usando pesos n_i/y_i .

Se hace de nuevo la regresión usando como pesos:

$$n_i / (1\beta_0 + 1\beta_1 X_i + 1\beta_2 X_i^2)$$

El proceso se repite hasta que los coeficientes β no cambian, lo cual se consigue generalmente con cinco iteraciones.

El intervalo de confianza para las estimaciones se obtiene mediante:

$$\hat{Y}_L^U(X) = X' \beta \pm \sqrt{X'_{3,1-\alpha} X' (X' V^{-1} X)^{-1} X}$$

donde el vector x' es $(1, x, x^2)$

El vector es b' es $(\beta_0, \beta_1, \beta_2)$

X es la matriz

V^{-1} es la matriz diagonal de elemento:

$$X = \begin{bmatrix} 1 & X_1 & X_1^2 \\ 1 & X_1 & X_1^2 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & X_N & X_N^2 \end{bmatrix}$$

$$\frac{n_i}{y_i}$$

$X^2_{3,1-\alpha}$ es el percentil $(1-\alpha).100$ de la distribución ji-cuadrado con 3 grados de libertad.

El procedimiento se aplicó a los datos de rayos gamma y el punto correspondiente a 300 cGy quedó fuera del intervalo de confianza. Se eliminó dicho punto y se repitió el procedimiento obteniéndose:

$$y = 0.005575 + 0.000953x - 4.221 (10^{-6}) x^2$$

con un $R^2 = 0.977$

La matriz para evaluar los intervalos de confianza es:

$$(X'V^{-1}X)^{-1} = \begin{bmatrix} 1.07E-05 & -1.1E-07 & 1.88E-10 \\ -1E-07 & 7.5E-09 & 1.8E-11 \\ 1.88E-10 & -1.8E-11 & 4.65E-14 \end{bmatrix}$$

el valor de $X^2_{3,0.95}$ es 7.816

Para rayos X la curva obtenida es:

$$y = 0.007484 - 0.00004x + 6.8 (10^{-6}) x^2$$

La matriz para evaluar los intervalos de confianza es:

$$(X'V^{-1}X)^{-1} = \begin{bmatrix} 1.42E-05 & -2.3E-07 & 6.4E-10 \\ -2.3E-07 & 1.49E-08 & -5.4E-11 \\ 6.4E-10 & -5.4E-11 & 2.42E-13 \end{bmatrix}$$

Utilización de la curva: de los procedimientos recomendados para el empleo de la curva en la obtención de dosis a partir del número promedio de aberraciones por célula, se seleccionó el siguiente (6):

1. Determinar los límites inferior (Y_L) y superior (Y_U) para el promedio de dicéntricos/célula (y),

utilizando las tablas de la distribución de Poisson.

2. Determinar la dosis correspondiente a Y_L , en la curva superior este es el valor X_L .

3. Determinar el valor correspondiente a Y_U en la curva inferior este es el valor x_u .

EJEMPLO: de los casos estudiados para irradiación gamma el más alto presentó 10 cromosomas dicéntricos en 100 células. La dosis estimada con un intervalo de confianza del 95% se obtiene así:

1. De la tabla de distribución de Poisson de $\lambda=10$ se obtiene $Y_L=4/100=0.04$ y $Y_U=17/100=0.17$.

2. En la curva superior de la Figura 4 a 0.04 le corresponde una dosis de 55.

3. En la curva inferior a 0.17 le corresponde una dosis de 210.

La dosis se encuentra entre 55 y 210 cGy, con una probabilidad del 95%.

ANÁLISIS DE INDIVIDUOS LABORALMENTE EXPUESTOS

Para este grupo se tuvieron en cuenta los valores de los cromosomas dicéntricos (Tablas 3 a 5) obtenidos de individuos laboralmente expuestos a radiación X o gamma, con lecturas positivas por dosimetría de película (determinadas en el INEA y tomados individualmente para hallar en cada caso la dosis o rango de dosis que ha podido recibir, para su comparación; los resultados obtenidos se pueden observar en las Tablas 4 a 6, correlacionables con las dosis determinadas previamente mediante los métodos físicos de rutina. Sin embargo, la cantidad de cromosomas dicéntricos encontrados en individuos laboralmente expuestos a radiaciones fue superior en rayos gamma, pues presentaron un máximo de 10 cromosomas dicéntricos, con un rango entre 0 y 215 cGy, mientras que el número máximo de cromosomas dicéntricos para individuos laboralmente expuestos a rayos X fue de 7, con un rango entre 0 y 145 cGy.

RAYOS GAMMA

La respuesta individual a la radiación pudo incidir en los resultados obtenidos, pues se observa que para rayos gamma el número de

Tabla 3. Resultados obtenidos de 10 individuos laboralmente expuestos a radiación gamma.

Muestra Número	Fragmento Acéntrico	Cromosoma Dicéntrico	Poliploidia	Ruptura	Frag.
1	3	10		2	
2	2	4		4	
3	1	3		1	
4		7		2	
5		1		1	
6		1			
7	1	4		1	
8		1			
9		4		1	
10		2			
Totales	7	31		12	

Tabla 4. Resultados de la estimación de los valores obtenidos para individuos laboralmente expuestos a rayos Gamma.

Muestra Resultados	Valores Poisson	Valores/100	Resultados Extrapolación (cGY)
1	0-3	0.0-0.03	0-30
2	0-5	0.0-0.05	0-55
3	0-7	0.0-0.07	0-80
4	1-8	0.01-0.08	0-100
7	2-13	0.02-0.13	10-155
10	4-17	0.04-0.17	25-215

cromosomas dicéntricos encontrados en el punto de 300 cGy es inferior al encontrado en la dosis anterior (250 cGy); además el número de cromosomas dicéntricos fue inferior a los encontrados en la dosis de 350 cGy. Se puede asumir también que a dosis de 300 cGy, el efecto en las muestras utilizadas haya sido menos severo como para dañar el DNA en la células o que hayan tenido un alto poder de reparación del DNA de las células en cultivo. Sin embargo, la explicación más factible para las lecturas obtenidas a dosis de 300 cGy gamma fue la obtención de cultivos muy cerrados, con la posibilidad de errores en las lecturas al microscopio.

Es de anotar que en ninguno de los casos se observó contaminación con bacterias, hongos o

Tabla 5. Resultados obtenidos de 10 individuos laboralmente expuestos a radiación X.

Muestra Número	Fragmento Acéntrico	Cromosoma Dicéntrico	Poliploidia	Ruptura	Frag.
1		4		2	1
2	1	3			
3		2		9	
4		4		4	
5		5		9	3
6	1	5		15	4
7		7		7	3
8		3	1	5	3
9	1	3		2	1
10	1	5	2	1	1
Totales	4	41	3	54	14

Tabla 6. Resultados de la estimación de los valores obtenidos para individuos laboralmente expuestos a rayos X.

Muestra Resultados	Valores Poisson	Valores/100	Resultados Extrapolación (cGY)
2	0-5	0.0-0.05	0-100
3	0-7	0.0-0.07	0-110
4	1-8	0.01-0.08	0-120
5	1-10	0.01-0.10	0-130
7	2-13	0.02-0.13	0-145

cualquier otro microorganismo patógeno, por lo cual la parte de contaminación con otros organismos no fue factor incidente en los resultados del análisis al microscopio. Se descarta el esquema de radiación como factor incidente en la variación de las lecturas a 300 cGy.

RAYOS X

Al analizar la curva de radiación X (Figura 5), se observa una buena relación hasta los 350 cGy, mientras que los valores de 400, 450 y 500 se eliminaron por quedar fuera del límite de confianza. De estos resultados podemos asumir que la respuesta celular no fue proporcional a dosis más altas de radiación. Los resultados de las observaciones al microscopio no fueron alteradas por la presencia de microorganismos patógenos como

hongos, bacterias y otros. La utilización para estos cultivos de algún reactivo que no conservaba las condiciones apropiadas, influyó en el escaso número de células y también en la mala consistencia de los cromosomas.

El efecto biológico producido por radiaciones X en cultivo de linfocitos *in vitro*, es superior al efecto producido por radiaciones gamma, pues a 350 cGy X, encontramos 0.8%, de cromosomas dicéntricos por célula, mientras que a la misma dosis de radiación gamma, encontramos 0.3% cromosomas dicéntricos por célula.

Dentro del trabajo se realizaron visitas a algunos centros hospitalarios (Hospital Militar, Clínica Shaio. Hospital San José, entre otros), con el

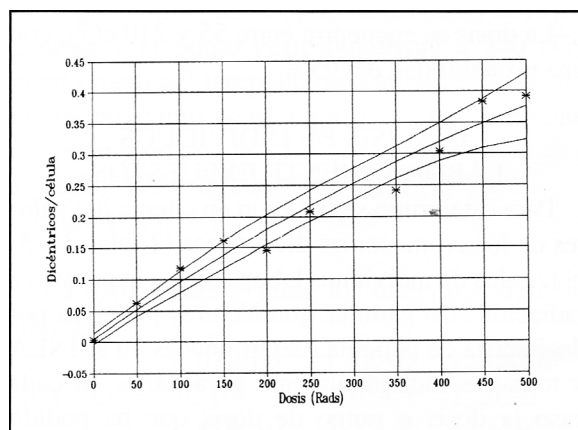


Figura 4. Curva dosis-respuesta con intervalo de confianza del 95% para rayos gamma.

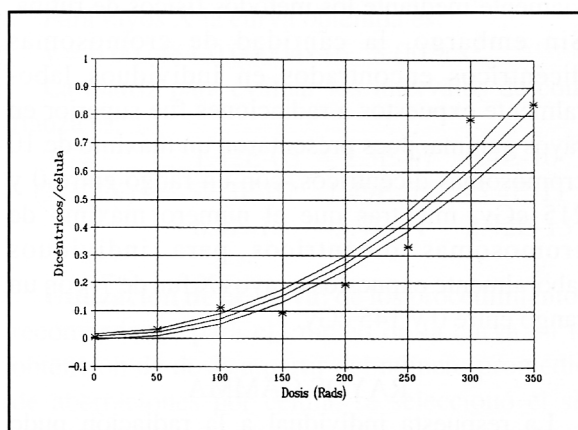


Figura 5. Curva dosis respuesta con intervalo de confianza del 95% para rayos X.

fin de establecer las condiciones de trabajo de las personas estudiadas y de las instalaciones; observándose que en procedimientos radiológicos de cateterismo se hallan los mayores índices de exposición a la radiación. Esta evaluación corroboró los datos de las dosis estimadas por otros medios dosimétricos (las monitorias y recomendaciones para instalaciones y procedimientos son motivo de otro trabajo que se adelanta para observación integral de la protección radiológica).

DISCUSION

Los primeros conocimientos sobre el efecto de las radiaciones se obtuvieron básicamente por métodos físicos; pero con el desarrollo en este campo se ha venido perfeccionando la utilización paralela de los métodos biológicos que permiten evaluar el daño producido por dicho efecto en las células.

Con la técnica de dosimetría citogenética se puede determinar el daño producido en las células de un organismo, mediante análisis de cromosomas obtenidos por cultivo de linfocitos humanos. Se han realizado estudios que establecen los efectos producidos por dosis de radiactividad natural (isótopos naturales, rayos cósmicos, etc.), encontrándose una relación no lineal con un pico sobre los 0.2 cGy, seguido por nivelación de la curva para aberraciones cromosómicas (8). Sin embargo, para estos casos las aberraciones cromatídicas no han mostrado dependencia de la dosis. Esto no ocurre en otras formas de irradiación, con dosis más significativas, donde se ha demostrado desde una reducción en la síntesis de DNA, hasta la muerte celular, tanto en humanos como en animales de experimentación (9-11).

La efectividad en la calidad de la radiación de fotones, neutrones y de iones pesados en células de mamíferos muestran dependencia de la energía lineal de transferencia (LET), definida como dE/dL, siendo dE el promedio de energía impartida localmente al medio por una partícula cargada de energía específica, mientras atraviesa una distancia dL (6,12-15).

Las aberraciones cromosómicas en sangre periférica humana son un parámetro reconocido de daño celular y se emplean como indicadores de

exposición a radiación ionizante y a ciertos químicos; teniendo en cuenta que es preciso, previamente, realizar curvas de calibración de muestras de sangre expuestas a dosis establecidas de radiación *in vitro* (16-18).

Existe variación de los resultados obtenidos en los diversos laboratorios, debido a una diferencia del análisis de las anomalías cromosómicas encontradas; pero también esta diferencia se puede deber a los cultivos en sí, a cambios en los procedimientos de radiación, calibración de las dosis y condiciones y tipo de dicha radiación, a idiosincrasia en la respuesta de los linfocitos de los donantes, a discrepancias metodológicas, como el goteo, la cosecha, tiempos de cultivo y el método de reconocimiento y clasificación de varios tipos de aberraciones. También la respuesta biológica ante la radiación varía entre tejidos y organismos, dependiendo de la radiosensibilidad: en iguales condiciones las dosis agudas producen más daño que las crónicas.

Hay factores adicionales en el análisis que pueden jugar un papel importante en la gran variación de los informes dosis-respuesta para radiaciones ionizantes y para algunas sustancias químicas (17, 19). Por esta razón se aconseja hacer curvas propias, pues los resultados varían en los diferentes laboratorios.

La dosimetría citogenética ha sido utilizada también como dosímetro biológico en pacientes con cáncer. Se han estudiado pacientes con patología oncológica familiar que pueden presentar una radiosensibilidad marcada debido a fallas de reparación del DNA en la fase G2 del ciclo celular (20-22). En análisis de rayos X y en estudios histológicos de nódulos linfáticos, se concluye que una microdosis que absorbe un linfocito no está en relación directa con la dosis absorbida por el sistema reticulohistiocitario, calculado en medidas biofísicas o simplemente establecido como una exitosa técnica en protección radiológica para suplementar métodos físicos en el caso de una sospecha o confirmando sobreexposición accidental a radiación ionizante externa o como estudio de radioexposición ocupacional (23-25).

Los efectos observados en los sobrevivientes

humanos en el bombardeo nuclear en Hiroshima y Nagasaki, que tuvieron un profundo impacto en los límites de exposición aceptados en la actualidad, especialmente la dosis de neutrones permisible por la medula ósea, han convertido la dosimetría citogenética en la dosimetría más segura para la determinación del efecto biológico de las radiaciones (26). En estos estudios se justifica el hecho de utilizar datos de Hiroshima en la incidencia de leucemia, como base para determinar límites para exposición de baja intensidad (27, 28).

Generalmente el personal del servicio de la salud es el que más está expuesto a agentes genotóxicos, radiaciones ionizantes, gas anestésico, etc., incrementándose cuando se asocia la radiación con la contaminación por agentes químicos (29, 30).

Se exploran hoy métodos más completos que complementan la dosimetría citogenética, como el de micronúcleos (MN). La relación entre la aparición de aberraciones cromosómicas y de MN es muy estrecha, pero algunas veces se ha visto una frecuencia de MN más baja que la de los fragmentos acéntricos (FA), encontrándose curvas dosis-respuesta lineales positivas con tendencia a la saturación a altas dosis (31-33). Sin embargo, se emplea más frecuentemente los MN como examen de rutina dada su fácil lectura (34-36).

Se ha encontrado que el incremento de la edad (más de 40 años) tiene un efecto significativo en la aparición de anomalías, pero no se han encontrado diferencias en relación con el sexo (35, 37). Por otra parte se han podido confirmar los resultados de dosimetría cromosómica aun a bajos rangos de dosis (38). La simulación de varios tipos de radiación sobre muestras de linfocitos "in vitro", semejando a lo que sucede en exposición total o parcial del cuerpo con radiación, resultó de un estudio entre varios países tratando de unificar el fenómeno para crear las curvas de dosis-respuesta en cada uno de los laboratorios (39)

Las curvas dosis-respuesta por efecto de radiaciones agudas en linfocitos, pueden no ser exactamente iguales en casos de exposición accidental real, o en casos de dosis acumuladas por tiempos

diferentes (manejo crónico de radioisótopos por personas ocupacionalmente expuestas).

Con base en los resultados obtenidos, se espera incrementar el número de muestras, tanto para maximizar las curvas de calibración, como para mejorar el análisis de pacientes. Se espera poder aplicar otras técnicas (MN) en los posteriores estudios, después de observar un número significativo que garantice el método. Otra posible manera de evaluar daño en el DNA de individuos laboralmente expuestos se realiza con cultivos de linfocitos para análisis de intercambio de cromátides hermanas; pero este tipo de estudio es el más dispendioso de todos los utilizados (40-42).

Una metodología útil para casos de preservación de células estudiadas, con la factibilidad de conservación para futuros estudios, es la de criopreservación de linfocitos, que permite desarrollar sobre la misma muestra diferentes tipos de análisis.

SUMMARY

A calibration curve was made in an *in vitro* study over 20 samples of blood from individuals with specific characteristics, radiated to different doses of gamma and X radiation, between 50 and 500 cGy at 50 cGy intervals per dose. Cultures of lymphocytes with conventional methods were made, and a study of chromosomal aberrations in a total of 500 metaphases per dose was performed.

These control curves were used to interpret the results for occupational individuals in order to discern the biological damage and to make an approach to the exposition dose. This study has started an investigation programme and the beginning of patient assistance in the field.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) por su participación en el entrenamiento del personal y en la evaluación de los estudios experimentales.

REFERENCIAS

1. Crane C, Zamora H.H, Bermúdez A.J, et al. Dosimetría citogenética. *Nucleares 1990*; 5(9-10): 10-18.
2. Crane C. Aplicación de curvas dosis-respuesta de radiación X y gamma, obtenidas mediante dosimetría citogenética. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. MSc. Genética. 1992.

3. **Zamora HH, Barreto GH.** Radioprotección en radiología. *Rev Col de Radiol.* 1991, 3(2): 24-32.
4. **INS.** Instituto Nacional de Salud. Citogenética Humana. Manual de procedimientos. INS. Nov de 1991.
5. **Merkle W.** Statistical methods in regression and calibration analysis of chromosome aberration data. *Radiat Environ Biophys.* 1983; **21**: 7-233.
6. International Atomic Energy Agency. Biological Dosimetry: Chromosome aberration analysis for dose assessment. Technical Report Series 1986; No 260. Viena, Austria.
7. **Gundy S, Varga L.P.** Chromosomal aberrations in healthy persons. 1983; **120**: 187-191.
8. **Pohl-Ruling J, Fisher P, Pohl E.** Chromosome Aberrations in peripheral blood lymphocytes dependent on various dose levels of natural radioactivity. Rep From Biological and environmental effects of low level radiation. 1976. Vol II IAEA Viena
9. **Shinohara K.** Lethality and the depression of DNA synthesis in U . V irradiated human and Xeroderma Pigmentosum cells. *Mutation Research* 1983;**22**: 385-389.
10. **Bajerska A, Liniecki J.** The yield of chromosomal aberrations in rabbit lymphocytes after irradiation in vitro and in vivo. *Mutat Research* 1975: 271-284.
11. **Liniecki J, Bajerska A, Wyszynska K.** Dose-response relationships for chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes after whole and partial-body irradiations. *Mutation Research* 1983: 103-110.
12. **Barendsen GW.** Influence of radiation quality on the effectiveness of small doses for induction of reproductive death and chromosome aberrations in mammalian cells. *Int J Radiat Biol.* 1979; **36**(1): 49-63.
13. **Todorov SL.** Relative genetic efficiency of SO MeV protons as derived from analyses chromosome anomalies in human lymphocytes. *Strahlentherapie* 1975; **149**: 188-193(No 2).
14. **Bauchinger M, Schmid E, Rimpl G.** Interaction distance of primary lesions in the formation of dicentric chromosome after irradiation of human lymphocytes with 3 MeV electrons in vitro. *Mutation Research* 1974; **25**: 83-87.
15. **Schmid E, Bauchinger M.** Chromosome aberrations in human lymphocytes after irradiation with 15.0 MeV neutrons in vitro. II Analysis of the number of absorption events and the interaction distance in the formation of dicentric chromosomes. *Mutation Research* 27: 111-117.
16. **Purrott RJ, Vulpis N, Lloyd DC.** Chromosome dosimetry: The influence of culture media on the proliferation of irradiated and unirradiated human lymphocytes. *Radiation Protection Dosimetry* 1981; **1**(3): 203-208.
17. **Vulpis N, Planetta G., Tognacci L.** Radiation-induced chromosome aberrations in radiological protection. Dose-response curves at low dose levels. *Int J Radiat Biol.* 1986; **29**(6): 595-600.
18. **Koteles GJ, Almasy Zs, Crane C, Gundy S, Kerekes J, Kormos Cs, Novak J, Szanislo F.** IAEA Coordinated research programme on the use of chromosome aberration analysis in radiation protection. Final Report on Research Contract No 3162/RB. 1990.
19. **Abbat JD, Bora KC, Quastel MR, Lefkovitch PL.** International reference study on the identification and scoring human chromosome aberrations. *Bull World Health Org* 1974; **50**: 373-388.
20. **Parshad R, Sanford KK, Jones GM.** Chromosomal radiosensitivity during G2 cell-cycle period of skin fibroblasts from individuals with familial cancer. *Proc Natl Acad Sci; USA* 1985; **82**: 5400-5403.
21. **Pyatkin EK, Alexandrov NN, Vorobyev AI et al.** Chromosome aberrations induced in human bone marrow cells by therapeutic local irradiation. Time and dose relationships. *Mutation Research* 1972; **16**:103-109.
22. **Though IM, Buckton KE, Baikie AG, Court.** X-Ray induced chromosome damage in man. Preliminary Communication. *Lancet* 1960; 5.
23. **Kemmer W, Steinstrasser A, Muth H.** Chromosome aberrations as a biological dosimeter in thorotrast: Dosimetric problems. *Environmental Research* 1979;**18**: 178-183.
24. **Lloyd DC, Purrott RJ.** Chromosome aberration analysis in radiological protection dosimetry 1981; **1**(1): 19-28.
25. **Bauchinger M, Eckerl H, Drexler G, et al.** Chromosome dosimetry and occupational radiation exposure. *Radiation Protection Dosimetry.* 1984; **9**(2): 93-97.
26. **Bender M A, Wong RMA.** Biological indicators of radiation quality DOE symposium: Réévaluation of dosimetric factors, Hiroshima and Nagasaki. *Germantown M.Dt* 1981; 15-16.
27. **Randolph ML, Brewen JG.** Estimation of whole body radiation by means of chromosome aberrations observed in survivors of the Hiroshima A-Bomb. *Radiation Research* 1980; **82**: 393-407.
28. **Hamilton LD, Nagy J.** Reanalysis of genetic effects of atomic bombs: comment and further analysis. *Health Physics* 1986; **26**(5): 1147-1149.
29. **Schull WJ.** Reproductive problems: Fertility, teratogenesis and mutagenesis. *Archives of environmental health* 1984; **39**(3): 207-212.
30. **Gundy S.** Cytogenetical studies on a large control population and on persons occupationally exposed to radiation and/or chemicals. *Ann Inst Super Sanita* 1989; **5**(4): 549-556.
31. **Savage John RK.** A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromosomal aberrations. *Mutation Research,* 1989; **207**: 33-36
32. **Todorov SL.** Radiation-induced chromosome aberrations in human peripheral lymphocytes. Exposure to X rays or protons. *Strahlentherapie* 1975; **149**: 197-204 (No. 2).
33. **Doggett NA, McKenzie W.H.** An analysis of the distribution and dose response of chromosome aberrations in lymphocytes after in vitro exposure to cesium gamma radiation. *Radiat Environ Biophys* 1983; **22**: 33-51.
34. **Kormos CS, Koteles GJ.** Various chromosome aberrations in lymphocytes for dose assessments in radiation accidents. *Radiation Protection-Selected Topics.* Dubrobnik. 1986.
35. **Norman A, Bass D, Roe D.** Screening human populations for chromosome aberrations. *Mutation Research* 1985;**143**: 155-160.
36. **Prosser JS, Lloyd DC, Edwards AA.** A comparison of chromosomal and micronuclear methods for radiation accident dosimetry. *Radiation Protection Theory and Practice. Session* 1989; **6**: 133-136.
37. **Norman A, Cochran S, Bass D, Roe D.** Effects of age, sex and diagnostic X-rays on chromosome damage. *Int J Radiat Biol* 1984; **46**(3): 317-321.
38. **Joksic G.** Micronuclei as quantitative indicators of chromosomal aberrations in human lymphocytes after in vitro X and Gamma irradiation. *Radiation Protection. Selected Topics Dubrobnik* 1986; 2-6.
39. **Lloyd DC, Edwards AA, Prosser, et al.** Collaborative exercise on cytogenetic dosimetry for simulated whole and partial body accidental irradiation. *Mutation Research* 1987; **179**: 197-208.
40. **Aghamohammadi SZ, Goodheat DT, Savage JRK.** Production of chromosome aberrations, micronuclei and sister chromatid exchanges by 24 KeV epithermal neutrons in human Go lymphocytes. *Mutation Research* 1989; **211**: 225-230.
41. **Cohen BL.** Perspective on genetic effects of radiation. *Health Physics* 1986;**46**(5) 1113-1121.
42. **Bigatti P, Lamberty L, Aradito G, et al.** Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in occupationally exposed workers. *Med Lav.* 1985; **76**(4): 334-339.