

C.N.E.A. Biblioteca	
ARCHIVO PUBLICACIONES	
Nº 1	AÑO 1967

06.67.03

SI - 1

COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA
DEPENDIENTE DE LA PRESIDENCIA DE LA NACION
GERENCIA DE SEGURIDAD E INSPECCION

UTILIZACION DEL INDICE DE ABERRACIONES
CROMOSOMICAS COMO DOSIMETRO BIOLOGICO

E. Vander Elst, J. C. Giménez y D. Beninson

BUENOS AIRES

1 9 6 7

COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA
DEPENDIENTE DE LA PRESIDENCIA DE LA NACION
GERENCIA DE SEGURIDAD E INSPECCION

UTILIZACION DEL INDICE DE ABERRACIONES
CROMOSOMICAS COMO DOSIMETRO BIOLOGICO

E. Vander Elst, J. C. Giménez y D. Beninson

BUENOS AIRES

1 9 6 7

1. Introducción.

La posibilidad de usar el índice de aberraciones cromosómicas como dosímetro biológico ha cobrado un gran interés en el campo de la Protección Radiosanitaria en los últimos años. (1,2,3,4,5,6,7).

Numerosos autores han observado los efectos de la radiación a nivel cromosómico en diversos tejidos de animales de experimentación (8) y seres humanos, siendo las células blancas de la sangre periférica las que ofrecen más posibilidades en la Dosimetría Biológica. En efecto, la rápida y permanente circulación sanguínea permite, en caso de una irradiación, obtener a partir de una muestra de sangre la dosis-promedio recibida por el individuo. Por otra parte, la posibilidad de repetir el análisis y de obtener, de esa forma, una mejor estadística constituye ciertamente una ventaja apreciable.

Recién en el año 1960 (9) fue desarrollada una técnica que posibilita la inducción de mitosis en cultivos de células de la serie blanca de la sangre circulante. Esto permitió la confección de cariotipos individuales y la observación de aberraciones en los cromosomas de dichas células.

Una de las características más salientes de las células de la serie blanca que se reproducen en cultivo es la de encontrarse, mientras circulan en el torrente circulatorio, en el estadio de pre-síntesis de D.N.A., es decir en la etapa de interfase llamada G_1 (10). Esto implica que en el momento de la irradiación las células involucradas se encuentran todas en el mismo estadio y por lo tanto se evita el problema de cualquier diferencia de sensibilidad según las etapas del ciclo de reproducción.

Repetidas observaciones han mostrado que la irradiación de células en el estadio de interfase produce solamente aberraciones cromosómicas y que prácticamente no se han observado aberraciones cromátidas.

Un tejido que presenta cierto interés en Dosimetría Biológica es la médula ósea por contener las células precursoras de la serie blanca en sangre periférica. El análisis de las aberraciones cromosómicas de la médula no permite establecer la dosis-promedio de una irradiación, sino la dosis recibida en el lugar de extracción de la muestra. No obstante, el interés de su estudio reside en la comparación de los valores observados con los correspondientes a sangre periférica y en el hecho que las células de la médula ósea solamente necesitan dos horas de cultivo sin estimulante (11) (en oposición con 72 horas de cultivo con fitohemoaglutinina para las células de la sangre circulante).

El propósito de este trabajo es la determinación de un índice de aberraciones cromosómicas en función de la dosis recibida con el objeto de poder disponer, en caso de una irradiación accidental, de una estimación de la dosis promedio en todo el cuerpo. Los órganos elegidos fueron sangre periférica y médula ósea, éste último con el objeto de comparar y ensayar técnicas muy rápidas de determinación del efecto observado.

2. Aberraciones cromosómicas observadas.

Ha sido descripta una gran variedad de aberraciones cromosómicas con mayor o menor facilidad para ser visualizadas. A los fines prácticos de eliminar errores subjetivos del observador y artefactos de técnica, se eligieron solamente dos tipos de aberraciones cromosómicas:

- a) Deleciones: Ruptura de un cromosoma y persistencia de la solución de continuidad. Para asegurar la existencia de esta aberración debe encontrarse en el cariotipo los dos fragmentos que componían originalmente el cromosoma. (Figura N°1).
- b) Dicéntricos y anillos: Estas aberraciones se producen por una doble fractura cromosómica. Si ocurre en el mismo cromosoma se puede formar un anillo más dos fragmentos. Si ocurre en dos cromosomas distintos los fragmentos que contienen el centrómero pueden unirse y formar un dicéntrico acompañado de uno o dos fragmentos acéntricos. La falta de estos fragmentos acéntricos no impide la computación de la aberración observada ya que esta última es inconfundible. (Figura N°2).

3. Métodos experimentales.

Las muestras de sangre humana (ocho dadores) se irradiaron "in vitro" con un equipo de Rayos X (220 KV, 15 mA, 1mm Cu, 1 mm Al) con una intensidad de dosis de 10 Rad/min. Después de la irradiación se realizó la separación de los glóbulos blancos por centrifugación lenta (250 r.p.m.) y el cultivo durante 72 horas en medio TC-199 (60-80%) con el agregado de fitohemoaglutinina y antibióticos (Técnica de Moorhead). A las 72 horas, luego del agregado de Colchicina, centrifugación y separación, se realizó el tratamiento hipotónico y la fijación en Carnoy.

La coloración se realizó con Giemsa al 10% modificando en ello la técnica de Moorhead que utilizó Orceína. La razón fue eliminar algunos artefactos de técnica que se producen con dicho colorante y que pueden ser confundidos con aberraciones cromosómicas.

Las muestras de médula ósea humana se obtuvieron por punción esternal (diez dadores) y se irradiaron en las mismas condiciones que la sangre periférica. Después de la irradiación las células se cultivaron durante dos horas según la técnica de Tjio y Whang a la cual se le hicieron algunas modificaciones (mejor difusión cromosómica utilizando varias soluciones de distinta hipotonía y coloración con Giemsa).

Las dosis experimentadas variaron en un rango de 25 a 300 Rads y la dosimetría se realizó con la ayuda de una cámara Victoreen de tipo standard.

El número de aberraciones cromosómicas se determinó en cien células para cada dosis.

4. Resultados obtenidos.

Según lo expresado en el punto 2., las aberraciones computadas son de dos tipos: las deleciones, fractura de un cromosoma sin posterior reparación y los dicéntricos y anillos, resultantes de dos fracturas cromosómicas con una ulterior soldadura.

En el primer caso existe una sola fractura, mientras en el segundo caso la producción de un anillo o un dicéntrico necesita respectivamente dos fracturas en el mismo cromosoma o una fractura en dos cromosomas distintos. Este mecanismo es generalmente aceptado por la mayoría de los autores e implica una cinética de producción distinta.

Los gráficos 1 y 2 representan el porcentaje de deleciones observadas por célula en sangre periférica y médula ósea en función de la dosis recibida.

El efecto observado en los gráficos 1 y 2 parece relacionarse con la dosis según la expresión:

$$F = a + b D \quad (1)$$

donde F: Fracción de deleciones observadas por células.

D: Dosis expresada en Rads.

a: Frecuencia espontánea de deleciones.

b: Coeficiente de producción de aberraciones radioinducidas.

Análogamente los gráficos 3 y 4 representan el porcentaje de anillos + dicéntricos observados por célula en sangre periférica y médula ósea respectivamente. Los datos pueden ajustarse convenientemente con una expresión cuadrática.

$$F' = c + d D^2 \quad (2)$$

donde : F', D, c y d tienen un significado equivalente a la expresión anterior.

Por regresión se obtuvieron valores para a, b, c, y d que figuran en la Tabla N° 1 estimándose muy fuerte la correlación.

Tabla N° 1

	<u>Deleciones</u>		<u>Anillos + Dicéntricos</u>	
	a	b	c	d
	(por cél. y por Rad)		(por cél. y por Rad ²)	
S. Perif.	0.011	8.1×10^{-4}	0.001	6.5×10^{-6}
Méd. ósea.	0.006	5.8×10^{-4}	0.008	5.1×10^{-6}

Resulta interesante destacar la similitud de los resultados obtenidos por diferentes investigadores. La Tabla N° 2 permite realizar la comparación de los valores experimentales obtenidos para los coeficientes de producción de aberraciones radioindu

cidas (b y d) en sangre periférica.

Tabla N° 2

	<u>Deleciones</u> (por cél.y por Rad)	<u>Anillos + Dicéntricos</u> (por cél.y por Rad ²)
Bender y Gooch (1964)	1.1×10^{-3}	5.2×10^{-6}
Grouchy (1963)	-	4.9×10^{-6} *
Gooch (1964)	0.9×10^{-3}	6.0×10^{-6}
Norman y Sasaki (1964)	-	2.7×10^{-6} #
Kelly y Brown (1965)	-	5.6×10^{-6} □
Norman y Sasaki (1966)	1.0×10^{-3}	5.7×10^{-6} ■
Nuestros valores (1967)	0.8×10^{-3}	6.5×10^{-6}

* Calculado a partir de datos presentados en la referencia bibliográfica N° 6. Tiempo de cultivo: 72 - 96 horas.

Tiempo de cultivo: 72 - 90 horas.

□ Calculado para el rango de dosis de 0-200 Rads. Tiempo de cultivo: 72 - 96 horas.

■ Tiempo de cultivo: 50 horas.

El análisis de los datos presentados en la Tabla N° 2 muestra poca dispersión en los índices de aberraciones radioinducidas, por lo menos para un rango de bajas dosis (0-200 Rads).

Algunos autores (12,13) han observado un índice de dicéntricos + anillos considerablemente mayor que los citados más arriba. Estos valores pueden deberse a diferencias de técnica o de criterios de observación. No obstante, como la utilización del ín-

dice de aberraciones cromosómicas en Dosimetría Biológica implica la necesidad de una técnica "standard" para su "calibración", pensamos que la presentada en este trabajo es satisfactoria sin perjuicio de mejorarla en el futuro y proceder, de esta manera, a una nueva calibración.

5. Discusión.

La utilización de los índices de aberraciones cromosómicas obtenidos en experimentos "in vitro" requiere un análisis cuidadoso de su extrapolación a irradiaciones "in vivo".

En efecto, en caso de una irradiación total del cuerpo en forma homogénea, la aplicación directa de las fórmulas (1) y/o (2) permite la estimación de la dosis recibida por el organismo. Sin embargo en la realidad este tipo de irradiación es muy poco frecuente en comparación a las irradiaciones parciales e inhomogéneas.

En estos casos es razonable esperar que distintos puntos del organismo sean irradiados con diferentes dosis.

Si admitimos que las expresiones (1) y (2) son válidas para cada fracción de sangre que recibió una dosis dada, el porcentaje total de aberraciones observadas será igual a la suma de las correspondientes a las diferentes fracciones.

Por lo tanto:

$$F = a + \sum b f_i D_i = a + b \bar{D}$$

Esta expresión permite la estimación de $\bar{D}$:

$$\bar{D} = \frac{F - a}{b} \quad (3)$$

Aplicando el mismo criterio a la expresión (2) tendremos:

$$F' = c + \sum d f_i D_i^2 = c + d \overline{D^2}$$

Como $\overline{D^2} \neq \overline{D}^2$ en el caso de irradiaciones inhomogéneas, solamente el índice de deleciones puede utilizarse para la estimación de la dosis-promedio.

No obstante, el valor de F' puede dar una idea del grado de inhomogeneidad de la irradiación. La variancia de la distribución espacial de las dosis es $\sigma^2 = \overline{D^2} - (\overline{D})^2$, y por lo tanto:

$$\sigma = \sqrt{\frac{F' - c}{d} - \left(\frac{F - a}{b}\right)^2} \quad (4)$$

La determinación del porcentaje de deleciones y anillos + dicéntricos en una muestra de sangre permite estimar la dosis-promedio y la desviación standard de la distribución espacial de dosis de cualquier tipo de irradiación.

El conocimiento de la desviación standard de la distribución espacial de dosis puede ser importante para el pronóstico de la enfermedad en un irradiado, ya que da una indicación sobre el grado de inhomogeneidad de la irradiación.

La estimación de inhomogeneidad a partir de determinaciones de la desviación standard implica el conocimiento de la función de distribución espacial de dosis. Esta distribución puede, a veces, estimarse a partir de las condiciones físicas del accidente. No obstante, aún en los casos en los cuales dicha información no puede ser obtenida diversos teoremas estadísticos permiten, al menos, acotar la dispersión de las dosis recibidas.

6. Conclusiones.

La utilización del índice de aberraciones cromosómicas

para la estimación de dosis en caso de irradiación del organismo es uno de los métodos de mayores posibilidades en Dosimetría Biológica. Es importante recalcar la necesidad de disponer de los índices de los dos tipos de aberraciones mencionados para una mejor estimación de las dosis recibidas y para posibilitar un mejor pronóstico respecto del daño producido.

La determinación de aberraciones cromosómicas en sangre periférica permite la estimación de la dosis-promedio y proporciona valiosa información sobre el grado de homogeneidad de la irradiación.

La determinación de los índices de aberraciones en médula ósea puede tener aplicaciones prácticas en los casos de irradiaciones de partes del organismo en las cuales puede ser importante conocer las dosis recibidas localmente por este tejido.

REFERENCIAS

1. Bender, M.A.; Gooch, P.C.; Persistent chromosome aberrations in irradiated human subjects.
Rad. Res. 16: 44-53 (1962).
2. Bender, M.A.; Gooch, P.C., Persistent chromosome aberrations in irradiated human subjects.
II. Three and one-half year investigation.
Rad. Res. 18: 389-396 (1963).
3. Bender, M.A.; Gooch, P.C., Types and rates of x-ray induced chromosome aberrations in human blood irradiated in vitro.
Proc. Nat. Acad. Sci. (R.S.) 48: 512-532 (1962).
4. Kelly, S.; Brown, C.D., Chromosome aberrations as a biological dosimeter.
Amer. J. Public Health 55: 1419-1429 (1965).
5. Norman, A.; Ottoman, R.E.; Sasaki, M. et al.
The frequency of dicentrics in human leucocytes irradiated in vivo and in vitro.
Radiology 83: 108-110 (1964).
6. Grouchy, M.J.; Vallée, G.; Lamy, M., Analyse chromosomique de cellules humaines sanguines et médullaires après irradiation "in vitro".
"Comptes Rendus des Scéances de l'Académie des Sciences", Tome 257 - pág. 278 (1963).

7. Norman, A.; Sasaki, M.S., Chromosome-exchange aberrations in human lymphocytes.
Int. J. Rad. Biol.; Vol. 11. N° 4: 321-328 (1966).
8. Bender, M.A., X-ray induced chromosome aberrations in mammalian cells in vivo and in vitro.
Int. J. Rad. Biol. Suppl. 103-118 (1960).
9. Moorhead, P.S.; Nowil, P.C.; Mellman, W.J. et al.
Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. Expll. Cell. Res. 20: 613-616 (1960).
10. Bender, M.A.; Prescott, D.M.; DNA syntesis and mitosis in cultures of human peripheral leucocytes.
Exp. Cell. Res. 27: 221-229 (1962).
11. Tjio, J.H.; Whang, J.; Chromosome preparations of bone marrow cells without prior in vitro culture or in vivo colchicine administration.
Stain Technology 37: 1 Jan 1962.
12. Evans, H.J., Dose-response relations from in vitro studies, pp. in Human Radiation cytogenetics H.J. Evans, W.M. Court Brown, A.S. Mc Lean, eds., North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1967.
13. Visfeldt, J., Radiation-induced chromosome aberrations in human cells. Doctoral Thesis published as a Riso Report N° 117.
Danish Atomic Energy Commission (1966).

ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN SANGRE PERIFERICA
(DELECCIONES)

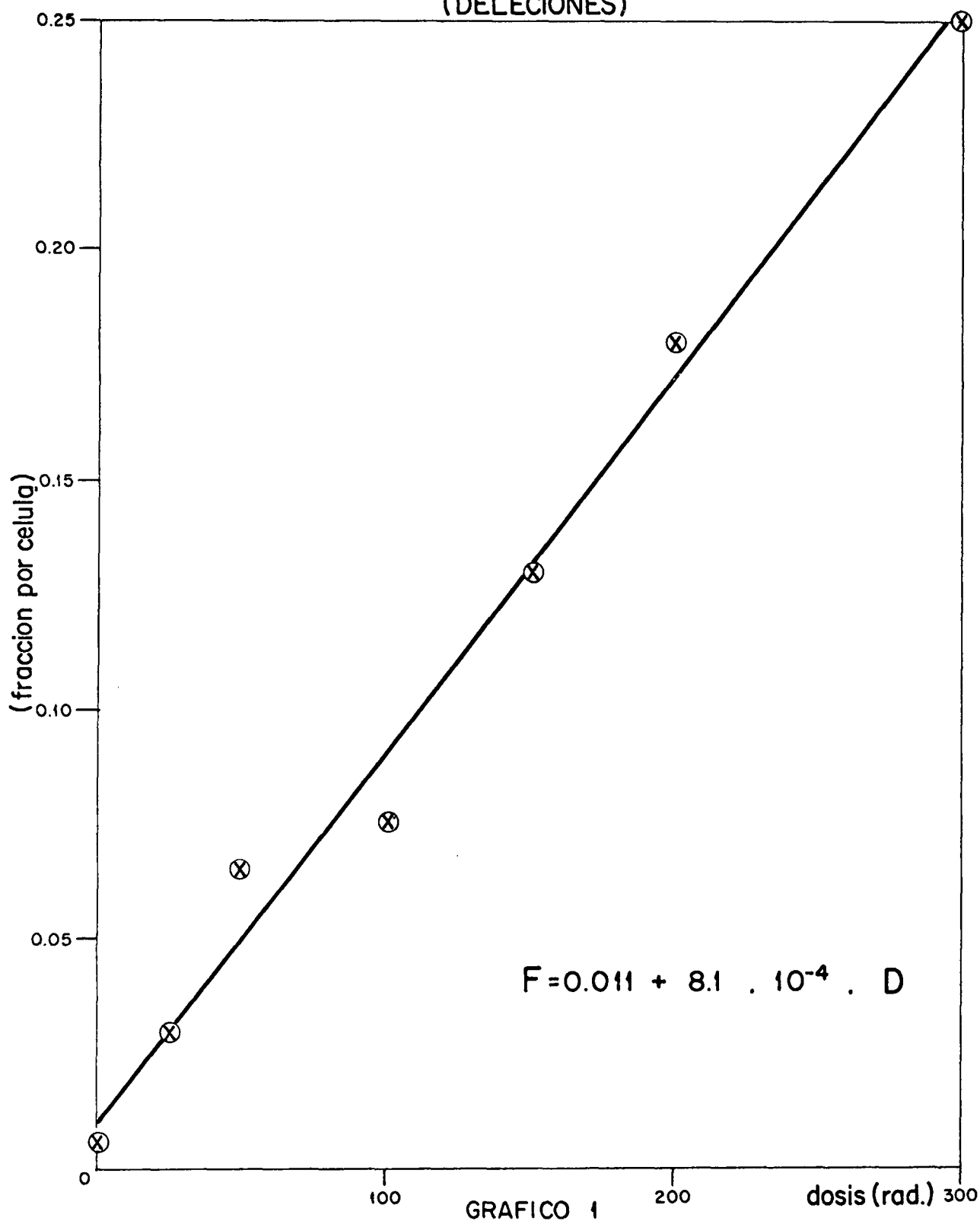


GRAFICO 1

ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN MEDULA OSEA
(DELECCIONES)

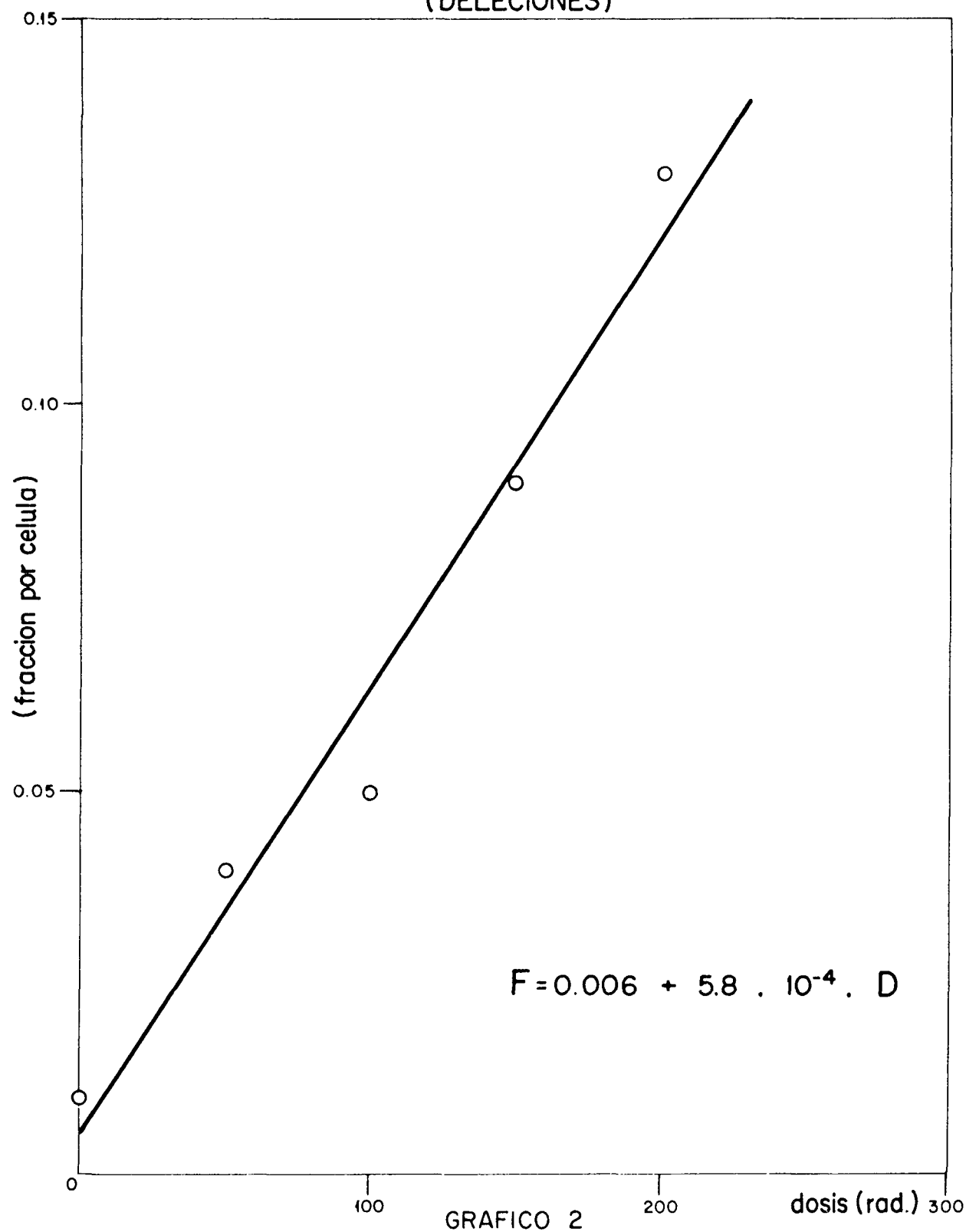
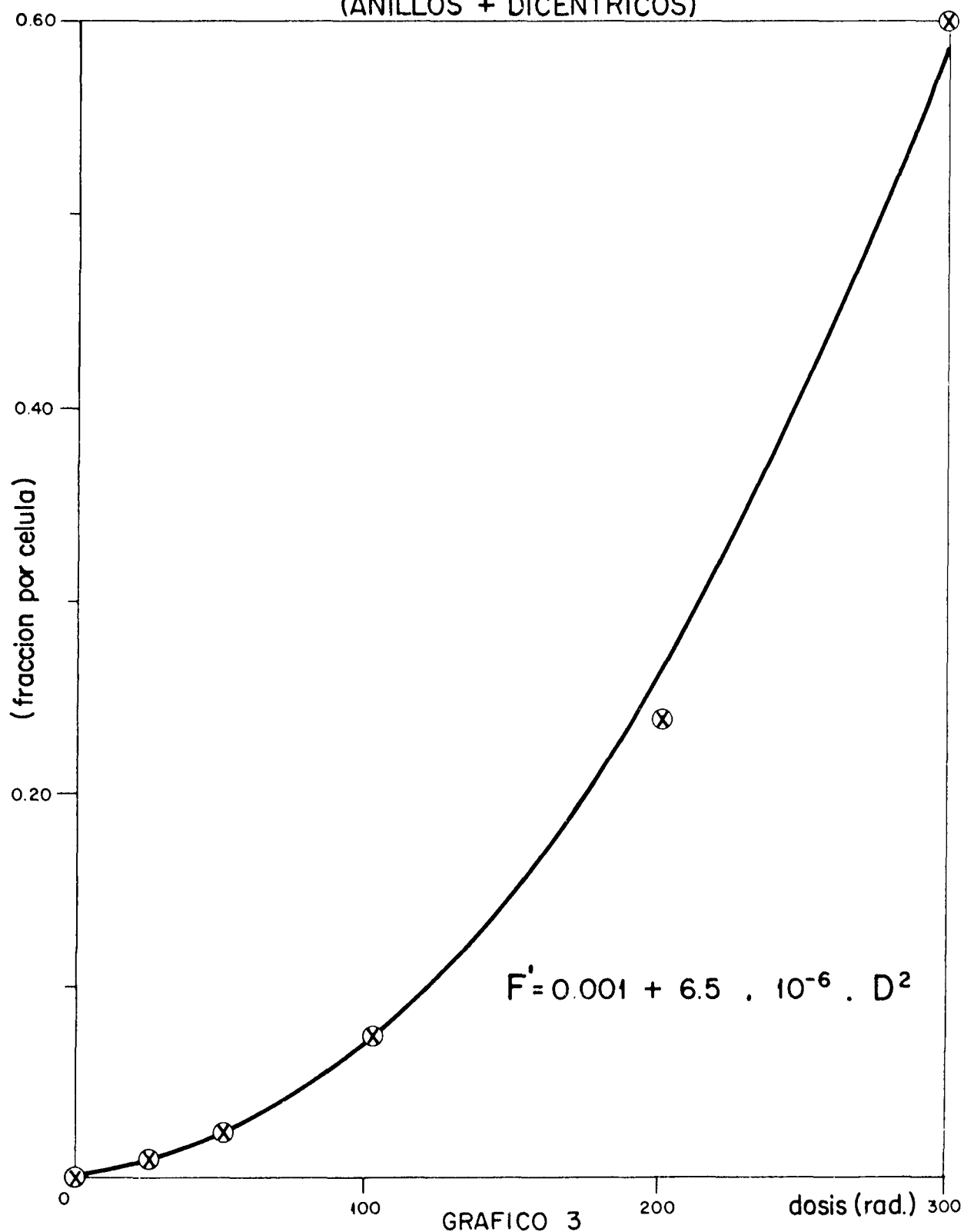
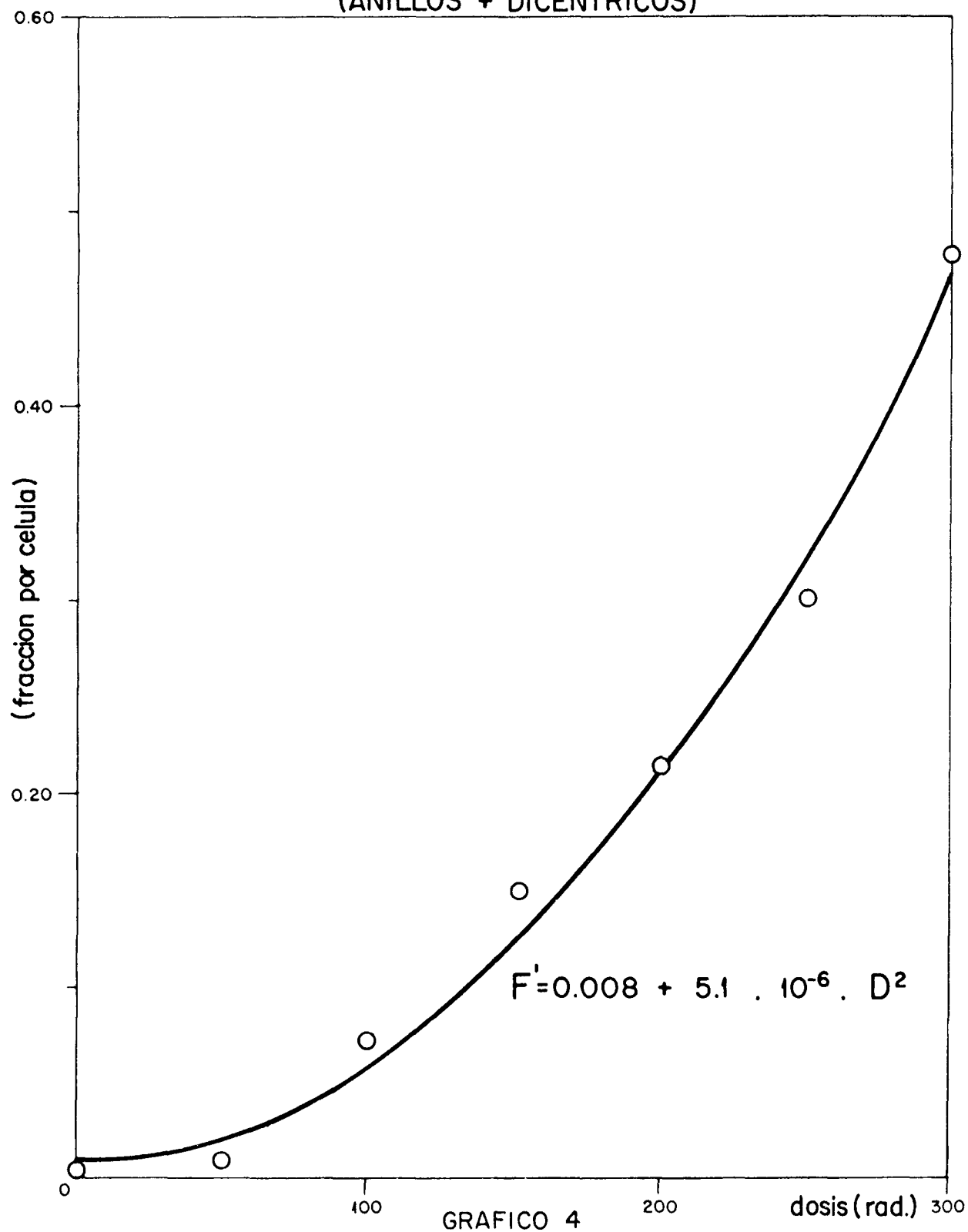


GRAFICO 2

ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN SANGRE PERIFERICA
(ANILLOS + DICENTRICOS)



ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN MEDULA OSEA
(ANILLOS + DICENTRICOS)



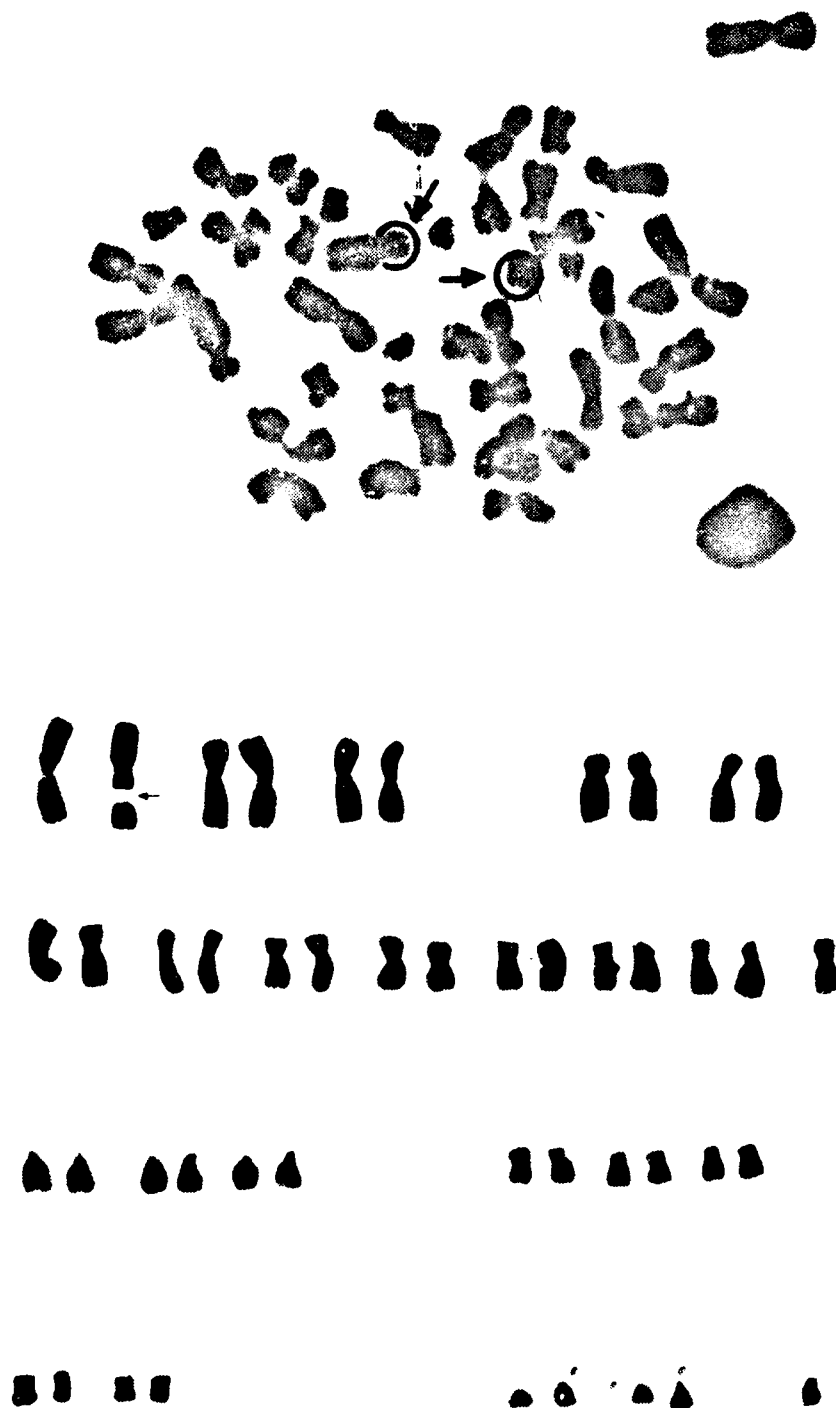


Figura N° 1

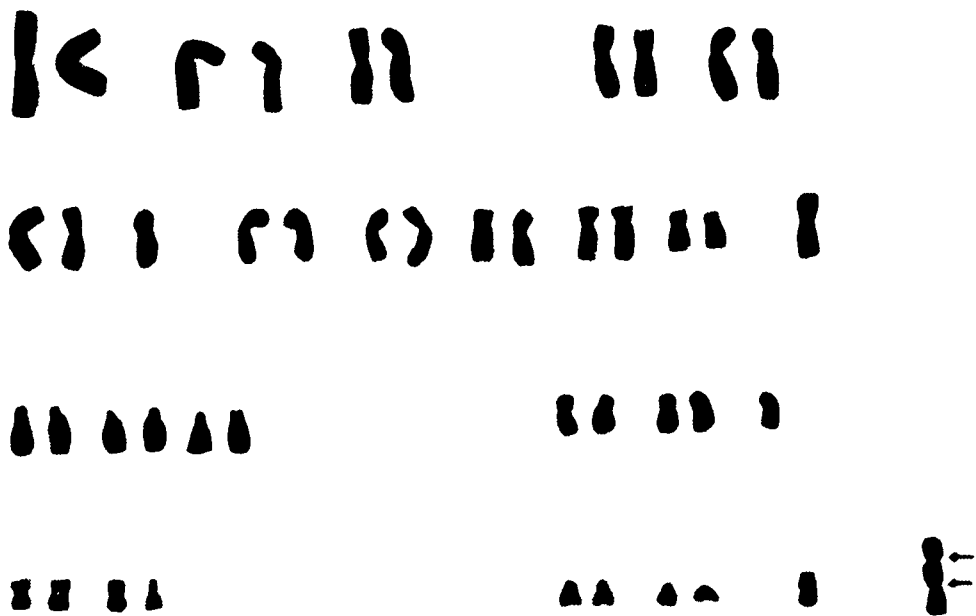


Figura N° 2