

PROTOCOLO NACIONAL DE DOSIMETRÍA BIOLÓGICA: DESARROLLO DEL PRIMER AÑO (2023)

Ana María Mercado, Amparo Olivares, José Antonio García y Miguel Alcaraz
Departamento de Radiología y Medicina Física. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia
anamaria.mercado@um.es, amparo.o.r@um.es, gamuz@um.es, mab@um.es.

RESUMEN

En los últimos años, el riesgo de un evento radiológico a gran escala se ha incrementado notablemente. Las redes de trabajo entre laboratorios que dominen diferentes técnicas de dosimetría biológica proporcionan una gran oportunidad para distribuir la carga de trabajo y así permitir al equipo médico tener un dato fiable para determinar la posible evolución de los individuos afectados y dar la atención médica necesaria. En este proyecto de investigación, se realizaron diferentes ejercicios para entrenar a los participantes que aún no dominan las técnicas de biodosimetría con el fin de conseguir una unificación de los resultados y una actualización de conocimientos para aquellos que cuentan con experiencia previa. De esta manera, el intercambio de técnicas de biodosimetría entre los distintos laboratorios mejora el flujo de trabajo y disminuye la carga de análisis de muestras, situación a la que se podrían enfrentar ante una emergencia radiológica..

INTRODUCCIÓN

En una situación de emergencia radiológica, la determinación de la dosis de absorción en el individuo es de gran importancia al aportar información que contribuye en la planificación del tratamiento y en la valoración sobre un posible efecto determinista que se podría manifestar en las siguientes semanas y meses (1,5,6). En las últimas décadas, el uso de biomarcadores de daño cromosómico ha demostrado ser una herramienta valiosa para determinar la dosis de radiación recibida por un individuo mediante la existencia de una curva dosis – respuesta entre la dosis recibida y los indicadores biológicos estudiados, principalmente, en casos de exposiciones accidentales o en ausencia de dosimetría física. De esta manera, la dosimetría biológica se ha convertido en un recurso fundamental para el triaje de la población que determinará el manejo terapéutico de la víctima y la evaluación de riesgo a largo plazo (1,2,5,6).

En las exposiciones a las radiaciones existen una gran variedad de indicadores biológicos, como las mutaciones genéticas, modificación de ciertas proteínas, tales como γ -H2AX, o la manifestación de metabolitos intermediarios. Entre todos ellos, los biomarcadores citogenéticos se consideran los más sensibles y seguros para cuantificar la dosis de radiación absorbida (2). Las técnicas de dosimetría biológica más empleadas son: i) ensayo de cromosomas dicéntricos, ii) ensayo de micronúcleos con citocinesis bloqueada (CBMN), y iii) ensayo de condensación cromosómica prematura (2).

Los cromosomas dicéntricos inducidos por radiación en linfocitos de sangre periférica han sido la técnica gold standard en la dosimetría biológica al ser muy específicos ante los agentes que inducen roturas de doble cadena de ADN, entre los que se encuentra la radiación ionizante (1). Sin embargo, el análisis es largo en el tiempo, laborioso y requiere de personal cualificado, dando lugar a variaciones en los resultados obtenidos entre los laboratorios (2,6), por lo que no se considera una herramienta eficaz en situaciones de emergencia.

Una técnica prometedora para la dosimetría biológica en situaciones de triaje es el ensayo de micronúcleos con citocinesis bloqueada (CBMN). El ensayo de CBMN fue desarrollado originalmente por Fenech y Morley (7), y cuantifica la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas derivadas de linfocitos periféricos (1,2,5,6). Los micronúcleos se forman a partir de anomalías cromosómicas inestables, mal segregadas durante la división celular y consiste en fragmentos cromosómicos o cromosomas completos que no están incluidos en

el núcleo de células hijas. Este ensayo ha demostrado ser una prometedora herramienta para la clasificación de las víctimas en el manejo médico de una emergencia radiológica debido a su simplicidad y rápida cuantificación. En ensayo de CBMN es más rápido y requiere habilidades menos especializadas que la mayoría de los métodos citogenéticos, lo que le convierte en un método de alto rendimiento muy adecuado para la DB. (5,6).

El objetivo principal de este trabajo es exponer los diferentes ejercicios que se llevaron a cabo durante el primer año de elaboración del Protocolo Nacional en Dosimetría Biológica que, a su vez, tiene como principal propósito reunir a los laboratorios españoles con experiencia en técnicas de dosimetría biológica para poder establecer una red interactiva nacional de respuesta rápida frente a una emergencia radiológica a gran escala y promover sinergias que permitan un intercambio de conocimientos entre los distintos laboratorios.

CONTENIDO

Con el fin de elaborar un protocolo nacional e incrementar la armonización de las técnicas que se llevarán a cabo por los laboratorios participantes, se propuso la realización de diferentes ejercicios. Estos ejercicios consistían en estimar la dosis de radiación utilizando métodos de dosimetría biológica, e incluían el análisis de imágenes de ensayos biológicos, la intercomparación de estimaciones de dosis de muestras de sangre irradiadas y una simulación virtual de un accidente donde se requiera la actuación de todos los laboratorios nacionales..

LABORATORIOS INTEGRANTES

- o Instituto de Investigación Sanitaria la Fe (IISLAFE) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (H. La Fe)
- o Universidad de Murcia (UM)
- o Hospital General Universitario Gregorio Marañón (H.G. Marañón)
- o Universidad Autónoma de Barcelona (UAB)
- o Centro Oncológico de Galicia (COG)
- o Universidad de Sevilla (US)

El proyecto de investigación se resolvió de manera definitiva el 12 de diciembre de 2022, por la Secretaría General del Consejo de Seguridad Nuclear como órgano instructor para la concesión de las subvenciones a la realización de proyectos de I+D+i relacionados con las funciones del organismo, otorgando al proyecto de I+D+i de su equipo investigador, denominado “Elaboración de un protocolo nacional en dosimetría biológica”, la cantidad económica total de 99.960,00 euros. Una vez resuelta la convocatoria, se plantearon la

metodología y el plan de trabajo planteado en el proyecto de investigación. En este proyecto de 3 años de duración se han realizado los siguientes ejercicios:

1. Identificación de las características principales de cada laboratorio y la descripción de las técnicas de dosimetría biológica llevadas a cabo en cada laboratorio.
2. Análisis con imágenes de células en metafase para analizar las alteraciones cromosómicas tipo dicéntricos. Se debían anotar las alteraciones cromosómicas analizadas especificando el número de células analizadas, el tipo de alteraciones encontradas, clasificadas como dicéntricos y su correspondiente acéntrico, anillos y su correspondiente acéntrico y los acéntricos extra.
3. Simulacro de tipo “virtual” en el que se evaluó la capacidad de activación de cada laboratorio integrante. Para ello, se envió una tabla en la que se plasmaban los valores de dosis relativa estimados para cada ensayo: DIC: dicéntricos, TRANS: translocaciones, MN: micronúcleos, H2AX: histona H2AX, PCC: condensación prematura de cromosomas, EPR: resonancia paramagnética electrónica y OSL: luminiscencia ópticamente estimulada. En el mismo documento enviado se adjuntó una lista de casos a estudiar: cincuenta y cuatro casos que se debían clasificar en las categorías antes explicadas y, además, indicar la categoría de triaje en la que se clasificaría cada muestra.

RESULTADOS

EJERCICIO 1

Los resultados en relación con la información general de las entidades permiten incorporar dos ensayos en este protocolo nacional que se reflejan en la Tabla I.

Ensayo de Dicéntricos en linfocitos humanos irradiados	Ensayo de micronúcleos en linfocitos humanos bloqueados citocinéticamente mediante citocalasina B
Universidad de Sevilla	Universidad de Murcia
Centro Oncológico de Galicia	
Hospital General Universitario Gregorio Marañón	
Universidad de Barcelona	Universidad de Sevilla
Hospital La Fe	

EJERCICIO 2

La recopilación de los resultados obtenidos por las diferentes entidades en relación a la información de las frecuencias de cromosomas dicéntricos observados por célula para las distintas galerías, se realizó un resumen gráfico con el apoyo de la plataforma bioestadístico del IISLAFE en orden de menor a mayor frecuencia observada (Figura 1 y 2).

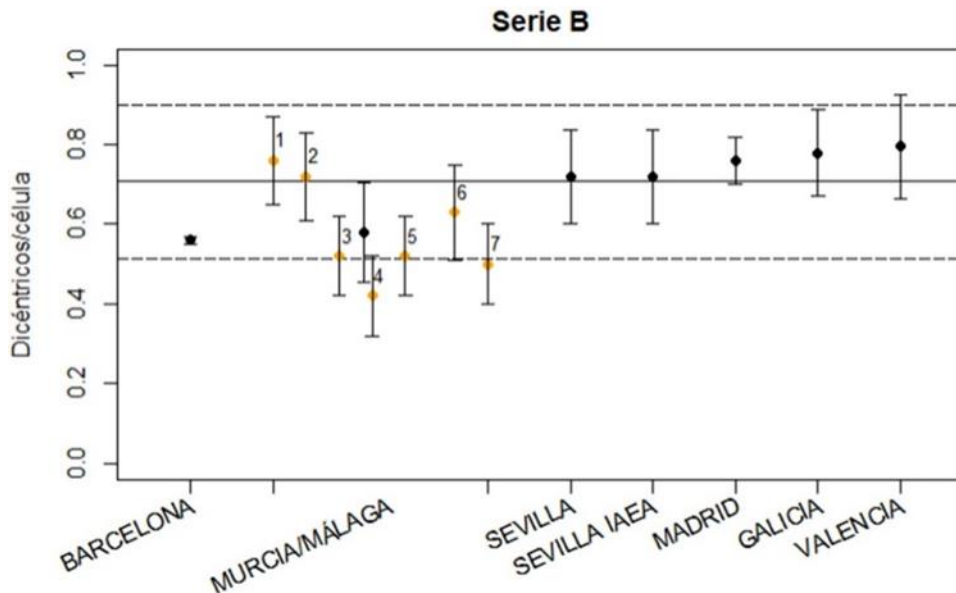


Figura 1. Gráfico intercomparativo de las frecuencias de cromosomas dicéntricos observados por célula para la serie B. Los puntos negros muestran las frecuencias promedio de cada laboratorio. Los puntos naranjas representan los diferentes sublaboratorios presentes en el grupo Murcia/Málaga. Las barras de error representan el error estándar de cada valor. La línea sólida horizontal representa el valor de la media robusta obtenida por todos

Figura 1. Gráfico intercomparativo de las frecuencias de cromosomas dicéntricos observados por célula para la serie B. Los puntos negros muestran las frecuencias promedio de cada laboratorio. Los puntos naranjas representan los diferentes sublaboratorios presentes en el grupo Murcia/Málaga. Las barras de error representan el error estándar de cada valor. La línea sólida horizontal representa el valor de la media robusta obtenida por todos los laboratorios. Las líneas discontinuas horizontales representan ± 1.96 desviación estándar robusta (intervalo de confianza 95% robusto).

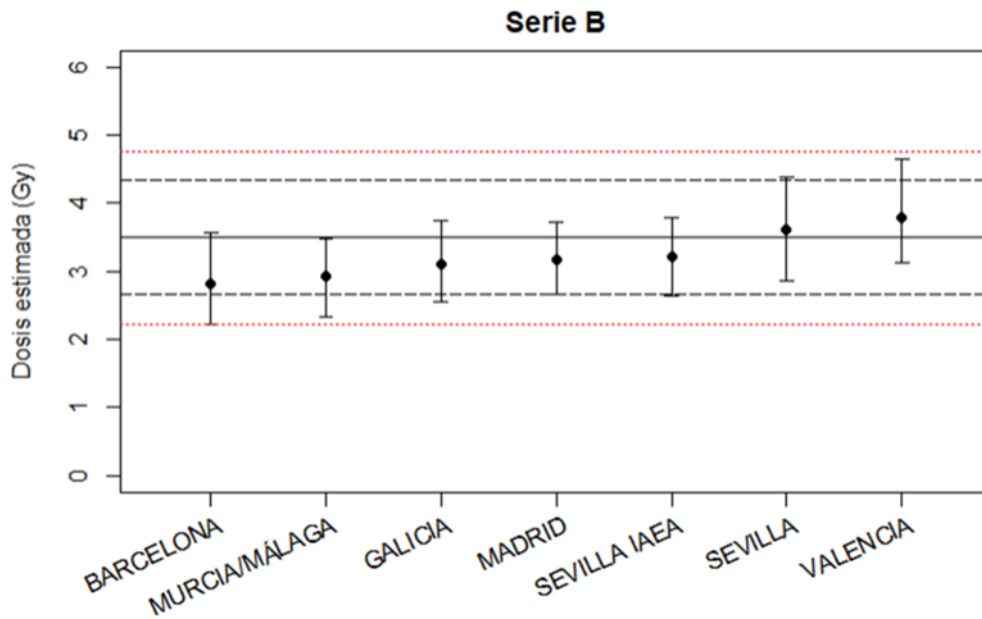


Figura 2. Gráfico intercomparativo con las dosis estimadas por los diferentes laboratorios para la serie B. Los puntos representan los valores medios obtenidos y sus barras de error su intervalo de confianza al 95%. La línea sólida horizontal marca el valor real de la dosis aplicada. Las líneas discontinuas indican los márgenes a aceptabilidad de ± 2 Zscores. Las líneas discontinuas rojas indican los márgenes de ± 3 Zscores. los laboratorios. Las líneas discontinuas horizontales representan ± 1.96 desviación estándar robusta (intervalo de confianza 95% robusto).

A continuación, se representan las dosis estimadas para la serie C a través de un resumen gráfico. Los laboratorios están ordenados de menor a mayor dosis media estimada.

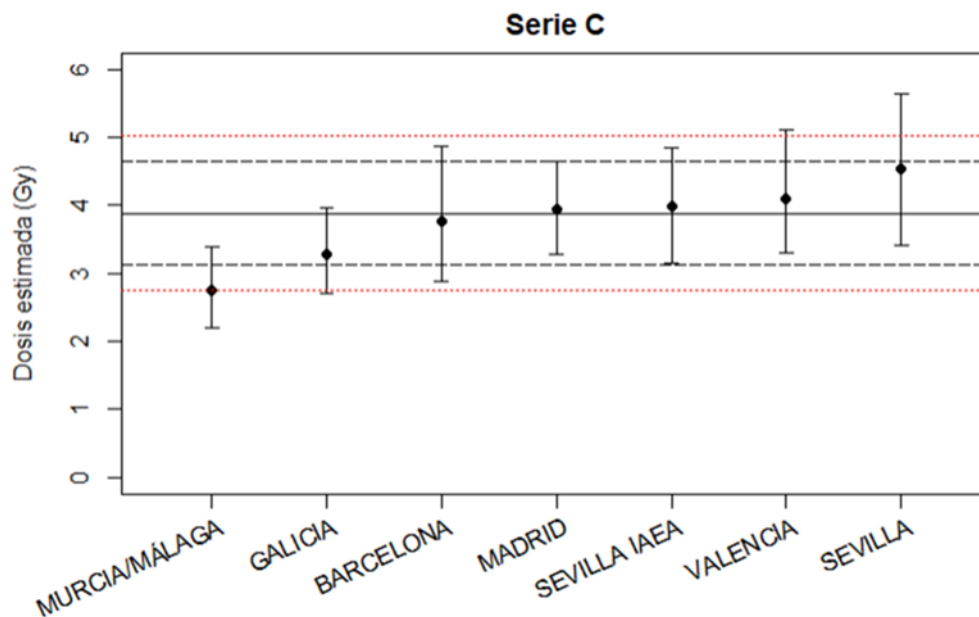


Figura 3: Gráfico intercomparativo con las dosis estimadas por los diferentes laboratorios para la serie C. Los puntos representan los valores medios obtenidos y sus barras de error su intervalo de confianza al 95%. La línea sólida horizontal marca el valor real de la dosis aplicada. Las líneas discontinuas indican los márgenes de aceptabilidad de ± 2 Zscores. Las líneas discontinuas rojas indican los márgenes de ± 3 Zscores

EJERCICIO 3

Se realizó la categoría del triaje como verde < 1 Gy, Naranja $1 - 2$ Gy y Rojo > 2 Gy de cincuenta y cuatro escenarios diferentes según el conjunto de datos dosimétricos que debían ser interpretados por cada laboratorio en términos de valores de dosis relativa estimados en cada ensayo de dosimetría biológica y, además, se determinó si la dosis había sido recibida a cuerpo entero o parcial, el momento en el que se recogió la muestra de sangre de la víctima, si la sangre había sido recogida el mismo día, un día después o una semana después y si los dispositivos electrónicos personales se encontraban fuera del haz o en el haz de radiación. Los resultados del ejercicio demostraron que, los laboratorios miembros de este proyecto de investigación están capacitados para responder de manera efectiva a una escala radiológica de emergencia.

La dosimetría biológica constituye una útil herramienta para identificar aquellos individuos que no han sido expuestos a radiación ionizante o que han recibido dosis de radiación muy bajas, con el fin de ayudar a reducir la presión de carga del sistema sanitario, dirigiendo adecuadamente los recursos sanitarios y disminuyendo el temor generalizado en la población. De esta manera, las redes de trabajo entre diferentes laboratorios proporcionan una gran oportunidad para distribuir la carga de trabajo y aumentar el número de muestras que puedan ser procesadas en un tiempo determinado. En Europa, la asociación de trabajo internacional RENE (Running the European Network of Biological and Physical retrospective Dosimetry) se ha establecido para asegurar la disponibilidad, calidad y eficiencia de la dosimetría retrospectiva física y biológica y para identificar las necesidades de entrenamiento y armonización de las organizaciones miembro. Los controles de calidad mediante comparaciones periódicas entre los laboratorios permiten evaluar el desempeño de los laboratorios e identificar las necesidades para optimizar la comunicación y el flujo de trabajo de los integrantes con el fin de optimizar la preparación antes posibles eventos de emergencia radiológica. Estas revisiones periódicas llevadas a cabo en la red RENE consisten en simular diversas situaciones de exposición real para validar y mejorar los procedimientos de las distintas técnicas de dosimetría biológica (4).

En lo que respecta a este proyecto de investigación, se puede destacar que, a través de los cuestionarios proporcionados en las tareas 1 y 2, todos los laboratorios tienen un amplio conocimiento y experiencia en el ensayo de identificación de cromosomas dicéntricos; a excepción de la Universidad de Murcia y Málaga ya que su experiencia se centra en el empleo de otras técnicas de biodosimetría, como el ensayo in vivo sobre policromatófilos de médula ósea de roedor, ensayo in vivo sobre reticulocitos de roedor, ensayo in vitro sobre linfocitos humanos irradiados con bloqueo citocinético con citocalasina b y ensayo de micronúcleos en efecto bystander in vivo e in vitro.

En todo caso, se pone de manifiesto la necesidad de entrenar a los participantes que aún no dominan las técnicas de biodosimetría para conseguir una unificación de los resultados y una actualización de conocimientos para aquellos que cuentan con experiencia previa. De esta manera, intercambiando las técnicas de biodosimetría entre los distintos laboratorios se puede mejorar el flujo de trabajo y así disminuir la carga de análisis de muestras, situación a la que se podrían enfrentar ante una emergencia radiológica.

La próxima tarea por desarrollar consistirá en la intercomparación de ensayos de dosimetría biológica para estimación de dosis y clasificación de personas afectadas, que incluirá la extracción de muestras de sangre, su irradiación y envío a los diferentes laboratorios integrantes del proyecto de investigación.

CONCLUSIÓN

La recolección de información sobre los distintos laboratorios integrantes de este proyecto de investigación a través de encuestas y la realización de ejercicios para entrenar a los participantes tanto en las técnicas de biodosimetría que desempeñan de manera usual como en aquellas por adquirir; con el fin de permitir la coordinación de la respuesta ante la posibilidad de una gran cantidad de datos que se generarían en caso de un suceso radiológico importante y pudiendo formar parte de la formación general ante emergencias radiológicas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado gracias a una Ayuda Nacional Competitiva del Programa I+D+i del Consejo de Seguridad Nuclear para el periodo de años 2023-25.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mendes ME, Mendonça JCG, Barquinero JF, Higuera M, Gonzalez JE, Andrade AMG et al. Comparative study of micronucleus assays and dicentric plus ring

chromosomes for dose assessment in particular cases of partial-body exposure. *Int J Radiat Biol.* 2019; 95(8):1058-1071.

2. Herate C, Sabatier L. Retrospective biodosimetry techniques: Focus on cytogenetics assays for individuals exposed to ionizing radiation. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2020; 783:108287.

3. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(4):1534.

4. Endesfelder D, Oestreicher U, Kulka U, Ainsbury E.A., Moquet J, Barnard S et al., RENE/ EURADOS field exercise 2019: robust dose estimation under outdoor conditions based on the dicentric chromosome assay. *Int. J. Radiat. Biol.* 2021; 97(9):1181-1198.

5. Pujol-Canadell M, Perrier JR, Cunha L, Shuryak I, Harken A, Garty G et al. Cytogenetically-based biodosimetry after high doses of radiation. *PLoS One.* 2020; 15(4):e0228350.

6. Sioen S, Cloet K, Vral A, Baeyens A. The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay on Human Isolated Fresh and Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Pers Med.* 2020; 10(3):125.

7. Fenech M., Morley A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 1985; 147:29–36.