Modelo de superficie para biodosimetría basado en la detección de focos γ -H2AX

Juan S. López ¹, Mònica Pujol- Canadell ¹, Pedro Puig ^{2,3}, Pablo Carrasco ⁴, Gemma Armengol ¹, Joan F. Barquinero ^{1*}

¹ Unitat d'Antropologia Biològica, Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193, Bellaterra, España.

² Departamento de Matemáticas, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, España

³ Centre de Recerca Matemàtica, E-08193 Bellaterra, España.

⁴ Servei de Radiofísica i Radioprotecció, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret 167, Barcelona 08025, España.

Resumen

En caso de accidente radiológico que afecte a víctimas potencialmente irradiadas y para hacer frente a posibles consecuencias adversas para la salud, es necesario realizar un cribado. El análisis de dicéntricos inducidos por las radiaciones ionizantes (IR) se considera el método estándar en dosimetría biológica (IAEA 2011). Sin embargo, el análisis de dicéntricos requiere personal capacitado y es necesario cultivar células durante dos días. Como alternativa, se han propuesto biomarcadores rápidos de exposición, la mayoría de ellos basados en el daño del ADN inducido por la radiación (Roch-Lefèvre et al., 2010; Rothkamm et al., 2013). Entre los distintos daños del ADN inducidos por IR, las roturas de doble cadena (DSB) representan el tipo de lesión biológicamente más perjudicial y, en respuesta a las DSB inducidas, la histona H2AX se fosforila rápidamente en Ser-139 (γ -H2AX). Esta fosforilación se extiende rápidamente sobre varias megabases en la cromatina adyacente y puede detectarse microscópicamente mediante anticuerpos fluorescentes específicos como focos de γ -H2AX (Rogakou et al. 1999). Una vez sea reparado el DSB la γ -H2AX se defosforila. El número de focos γ -H2AX inducidos por

IR aumenta linealmente con la dosis de radiación después de la exposición tanto in vitro como in vivo (Löbrich et al. 2005; Horn et al. 2011;). Actualmente la detección de focos γ -H2AX es un ensayo aceptado como herramienta de dosimetría biológica y cabe señalar que el procesamiento rápido de muestras de sangre para el ensayo γ -H2AX tiene un gran potencial para ser utilizado como un cribado rápido a utilizar en el caso de un número muy elevado de individuos potencialmente expuestos (Moquet et al. 2017).

El uso del ensayo de γ -H2AX en biodosimetría necesita un establecimiento previo de curvas de calibración y debido a la naturaleza transicional de la fosforilación cuando se utiliza el ensayo γ -H2AX para fines de dosimetría biológica, es obligatorio considerar el tiempo transcurrido entre la exposición y la recolección de la muestra de sangre, y luego utilizar una calibración adecuada que se haya establecido para este tiempo en particular. Esto significa que los laboratorios deben establecer curvas de calibración para diferentes tiempos posteriores a la irradiación (Roch-Lefèvre et al. 2010). En esta presentación se propone un modelo tridimensional o de superficie que permite estimar una exposición utilizando como entrada la frecuencia de focos γ -H2AX y cualquier tiempo post-irradiación durante las primeras 24 h tras la exposición.

Para la construcción del modelo se utilizaron muestras de sangre periférica de un varón sano de 54 años, y para su validación también se utilizó sangre de una mujer sana de 32 años. Las muestras de sangre se irradiaron con haces de fotones de 6 MV con un acelerador lineal TrueBeam (Varian Medical Systems, California, EE. UU.) Durante la irradiación se utilizó una configuración isocéntrica con dos campos opuestos de 30 cm X 30 cm (0° y 180°) para garantizar la irradiación homogénea de las muestras de sangre. Para irradiar las muestras de sangre, se colocaron tubos dentro de dos orificios perforados en un maniquí de polimetilmetacrilato (PMMA) de 20 cm X 20 cm con 20 cm de espesor en la dirección de los haces. Las dosis utilizadas para obtener la calibración fueron de 0,

0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 y 3 Gy. Después de la irradiación, se incubaron a 37 °C durante 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 h. Para validar el modelo, se realizaron dos experimentos diferentes siguiendo el mismo protocolo utilizado para obtener los datos de calibración.

El análisis de los focos se realizó mediante inmunofluorescencia y para el análisis se utilizó microscopía automática utilizando un Metafer Scanning System (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altussheim , Alemania) acoplado a un Zeiss AxioImager.Z2 motorizado. Software Metafer4 (MetaSystems Hard & Software GmbH) v 3.10.2. Tanto para la obtención de la relación dosis-efecto como en los dos ejercicios de validación, se registraron 500 núcleos en cada muestra.

En la elaboración de la calibración, y para cada tiempo post-irradiación, la frecuencia de focos por núcleo aumentó con la dosis, con valores que fueron desde 1 foco por núcleo en las muestras no irradiadas hasta los 29 focos observados 0,5 h después de la irradiación de 3 Gy. Los resultados también mostraron que, para cada dosis, la frecuencia de focos disminuyó con el tiempo post-irradiación. Inicialmente, los resultados obtenidos para cada uno de los seis tiempos de post-irradiación analizados se ajustaron al modelo lineal $Y = c + a \cdot D$. Los coeficientes lineales de estas curvas fueron mayores en los tiempos de post-irradiación más cortos. Después de este primer ajuste y considerando todas las dosis y todos los tiempos de post-irradiación, las frecuencias de focos observadas se ajustaron a un único modelo de superficie $Y = c \cdot t^u + a \cdot t^v \cdot D$.

Las curvas dosis-efecto ajustadas al modelo lineal, así como al modelo de superficie fueron validadas en dos experimentos independientes con dos donantes. En el primer ejercicio de validación, las estimaciones de dosis se realizaron utilizando los coeficientes lineales, y el modelo de superficie. Cuando se utilizaron modelos lineales, en todos los casos, los intervalos de confianza del 95% de las dosis estimadas no incluyeron la dosis de 0 Gy, y en la mayoría de los casos, la dosis estimada cayó dentro de la región de las

dosis administradas ± 0.5 Gy. Las muestras evaluadas 24 h después de la irradiación fueron las que mostraron la estimación menos precisa. Cuando las estimaciones de dosis se realizaron utilizando el modelo de superficie se obtuvieron resultados similares. En cualquiera de las muestras, las dosis estimadas fueron 0 Gy, y para la mayoría de las muestras el 95% del intervalo de confianza de las dosis estimadas cayó en la región de $\pm 0,5$ Gy de la dosis administrada. Las estimaciones de dosis en el segundo ejercicio se realizaron utilizando el modelo de superficie. En la mayoría de los casos, los límites de confianza del 95% de las dosis estimadas cayeron dentro del intervalo de $\pm 0,5$ Gy de la dosis real. Los resultados obtenidos en la validación indican la solidez del modelo de superficie y su aplicabilidad. En conclusión, el modelo de superficie aquí presentado, que comprende las primeras 24 h post-irradiación, permite estimar de forma fiable la dosis recibida, con una precisión similar a las curvas dosis-efecto lineales, pero con la ventaja de que la estimación de la dosis puede evaluarse en cualquier momento post-irradiación.

Financiación

Este trabajo ha recibido apoyo financiero del Consejo de Seguridad Nuclear (BOE-A-2019-311).

Referencias

Horn S, Barnard S, Rothkamm K. 2011. Gamma-H2AX-based dose estimation for whole and partial body radiation exposure. PLoS One. 6(9): e25113

IAEA. 2011. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna, Austria: International Atomic Energy.

Löbrich M, Rief N, Kühne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C, Uder M. 2005. In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci U S A*.102(25):8984–8989.

Moquet J, Barnard S, Staynova A, Lindholm C, Monteiro Gil O, Martins V, Rößler U, Vral A, Vandevoorde C, Wojewódzka M, Rothkamm K. 2017. The second gamma-H2AX assay inter-comparison exercise carried out in the framework of the European biodosimetry network (RENEB). *Int J Radiat Biol*. 93(1):58–64.

Roch-Lefèvre S, Mandina T, Voisin Pascale, Géatan G, Mesa JEG, Valente M, Bonnesoeur P, García O, Voisin Philippe, Roy L. 2010. Quantification of γ -H2AX Foci in human lymphocytes: A method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure. *Radiat Res*. 174(2):185–194

Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*. 146(5):905–915.

Rothkamm Kai, Barnard S, Ainsbury EA, Al-hafidh J, Barquinero JF, Lindholm C, Moquet J, Perälä M, Roch-Lefèvre S, Scherthan H, et al. 2013. Manual versus automated γ -H2AX foci analysis across five European laboratories: Can this assay be used for rapid biodosimetry in a large scale radiation accident? *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 756(1–2):170–173.