

# **Evaluación mediante dosimetría biológica en casos de exposición heterogénea a las radiaciones ionizantes**

Pujol M <sup>1</sup> , Puig P <sup>2,3</sup> , Barquinero JF <sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup> Departament de Matemàtiques, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, España

<sup>3</sup> Centre de Recerca Matemàtica, E-08193 Bellaterra, España.

## **RESUMEN**

En dosimetría biológica el método más utilizado es el análisis de cromosomas dicéntricos en metafases de linfocitos de sangre periférica (IAEA, 2011). En el caso de una exposición homogénea de cuerpo entero, se supone que todos los linfocitos del cuerpo reciben aproximadamente la misma dosis física, y la distribución de dicéntricos por célula se ajusta a un Poisson (Edwards et al, 1979). En exposiciones no homogéneas (Sreedevi et al., 1993), donde la población de linfocitos contiene una mezcla de células no expuestas y expuestas a diferentes dosis, la distribución de dicéntricos entre las células tiende a ser sobredispersa, y esto se utiliza para detectar la heterogeneidad. En casos de irradiaciones no homogéneas, para estimar la dosis recibida y la fracción del cuerpo irradiado un método recomendado el método de la Poisson contaminada en el cero, en dosimetría se conoce como método "Dolphin" (Dolphin, 1969). Este método considera todas las exposiciones no homogéneas como exposiciones parciales. Sin embargo, considerar todas las exposiciones no homogéneas como exposiciones corporales parciales representa una situación bastante idealizada. En la mayoría de los accidentes por radiación, las víctimas reciben un gradiente de dosis, y en estos casos la estimación de una dosis y de una fracción irradiada, se convierte en una simplificación que puede alejarse mucho de la situación real (SevanKaev et al, 1999, 2002, Liu et al, 2008).

En esta presentación se muestra un nuevo enfoque matemático basado en un modelo de Poisson mixto (McLachlan et al 2000) que se puede utilizar en casos en los que se detecta sobredispersión. El modelo permite la división de dos distribuciones diferentes. La

eficacia del método se ha validado mezclando muestras de sangre de donantes femeninos y masculinos para simular irradiaciones corporales parciales y heterogéneas. Además, el modelo también se ha validado para dosis muy altas, hasta 17 Gy, utilizando cultivos tratados con cafeína para aumentar el índice mitótico (Pujol et al, 2012).

Para evaluar el método estadístico se obtuvieron muestras de sangre periférica de una mujer de 26 años y un hombre de 54 años, ambos sin antecedentes de exposición a agentes clastógenos. Las muestras fueron irradiadas a las dosis a 0, 1, 2, 4, 6, 10 y 17 Gy en una fuente Gamma 137Cs (IBL437C, CIS Biointernational , GIF Yvette, Francia) a una tasa de dosis de  $5,02 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ . Una vez irradiadas las muestras de sangre periférica se cultivaron siguiendo el protocolo estándar (IAEA, 2011), al que se le añadió cafeína con el fin de obtener un mejor rendimiento de la técnica.

El diseño experimental de este estudio se basó en el cocultivo de muestras de sangre de dos donantes irradiadas a diferentes dosis. Estudios preliminares permitieron comprobar que el cocultivo de dos donantes no modifica el índice mitótico de cada donante, y que la proporción de la mezcla fue la misma que la proporción de metafases de cada donante, tanto para muestras no irradiadas como para muestras irradiadas.

Todas las simulaciones de irradiación heterogénea se realizaron para los dos donantes. A modo de ejemplo, para las simulaciones corporales parciales la mezcla de 2 y 4 Gy se realizó mezclando 17 Gy de sangre femenina irradiada (F12) con sangre masculina irradiada a 2 Gy irradiada (M4), y *viceversa* (M17F2). En todos los casos, el procesamiento del cultivo se realizó mediante tratamiento hipotónico seguido de solución fijadora de Carnoy. Para el análisis microscópico se utilizó la técnica de fluorescencia más Giemsa con tinción de Leishman. El análisis se realizó en un microscopio Zeiss Microscopio Imager.Z2 (Izasa , Barcelona, España) acoplado a un sistema de escaneo de portaobjetos Metafer® v3.10.2 ( Izasa , Barcelona, España). Se analizaron un mínimo de dos portaobjetos por experimento. El MI se determinó como la relación del número de metafases en 500 núcleos estimulados (IAEA, 2011). Los análisis cromosómicos se llevaron a cabo exclusivamente en metafases de primera división que contenían 46 centrómeros. En cultivos mixtos, para clasificar de qué donante provenían las células, se contaron los acrocéntricos y el cromosoma Y. En cultivos con sangre no irradiada, se analizaron un mínimo de 500 metafases. Para cultivos que simulaban exposiciones

corporales parciales, se analizaron un mínimo de 100 dicéntricos o 500 células. Para cultivos que simulaban exposiciones heterogéneas, se analizaron un mínimo de 200 dicéntricos. Durante el análisis los dicéntricos, tricéntricos, tetracéntricos y pentacéntricos se aceptaban solo cuando sus respectivos fragmentos acéntricos estaban presentes y se consideraron como uno, dos, tres o cuatro dicéntricos equivalentes respectivamente. La distribución de dicéntricos en cada simulación se comparó con la distribución de Poisson mediante la prueba U, valores U superiores a 1,96 indican irradiaciones no homogéneas. En casos de una exposición homogénea suponemos que una dosis de exposición a la radiación de baja LET produce un resultado de dicéntricos distribuido por Poisson. Esto significa que la probabilidad de observar un linfocito con k dicéntricos tiene la conocida expresión (1)

$$P(k; \lambda) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}, k = 0, 1, 2, \dots, (1)$$

dónde  $\lambda$  representa la frecuencia de dicéntricos que está estrechamente relacionado con la dosis. Sin embargo, para una exposición heterogénea con dos dosis de radiación X y Y, el resultado de la distribución de dicéntricos es una mezcla de dos distribuciones de Poisson que tienen una función de probabilidad de la forma (2)

$$P(k; \lambda_1, \lambda_2, \omega) = \omega \frac{\lambda_1^k e^{-\lambda_1}}{k!} + (1 - \omega) \frac{\lambda_2^k e^{-\lambda_2}}{k!}, k = 0, 1, 2, \dots (2)$$

dónde  $\lambda_1$  es la frecuencia de dicéntricos para la dosis X,  $\lambda_2$  es la frecuencia para la dosis Y. De manera similar,  $1-\omega$  puede entenderse como la proporción poblacional de células analizadas que han recibido una dosis Y.

Para todas las simulaciones, la distribución de dicéntricos observada en todas las células (células masculinas y femeninas juntas) se utilizó para obtener los valores iniciales estimados de la frecuencia de dicéntricos en cada fracción (masculina y femenina) y de la proporción estimada de células de cada donante. Las frecuencias y proporciones estimadas se compararon con las observadas en células femeninas o masculinas.

Las estimaciones de dosis se han realizado interpolando las frecuencias observadas o estimadas de dicéntricos (ya sea por el modelo de Poisson mixto o por el método de Dolphin) a las curvas de calibración apropiadas. Para cultivos de 48 h, tratados solo con colcemid se utilizaron curvas lineales-cuadráticas ( $Y = C + \alpha D + \beta D^2$ ) descritas

previamente (Pujol et al., 2012). Para cultivos con sangre irradiada a dosis muy elevadas ( $>4$  Gy) se utilizó una curva dosis-efecto tipo Gompertz  $\left(Y = \beta_0 e^{-\beta_1 e^{-\beta_2 d}}\right)$  (13). Para comparar el modelo de Poisson mixto propuesto en el presente trabajo con el método de Dolphin del manual del OIEA (IAEA, 2011),

De los resultados obtenidos de las irradiaciones parciales y con relación al porcentaje de células analizadas en cada simulación, el porcentaje de células irradiadas que alcanzaron metafase disminuyó a medida que se incrementó la dosis. En irradiaciones parciales simuladas cuando se añadió cafeína a los cultivos de 48 h, se observó un ligero aumento en la proporción de la fracción irradiada en comparación con los cultivos sin tratamiento con cafeína. Sin embargo, después 10 o 17 Gy, en los cultivos de 48h apenas se observa un aumento cuando se añade cafeína. En los cultivos de 57 h donde la cafeína estuvo presente durante 11 h de cultivo la proporción de células irradiadas que alcanzaron la metafase aumentó claramente en comparación con los cultivos de 48 h.

En todas las simulaciones de irradiaciones parciales los valores U fueron superiores a 1,96, lo que indicó una sobredispersión significativa. Esta desviación de Poisson fue mayor a medida que aumentaba la dosis. El modelo de Poisson Mixto permite descomponer dos distribuciones de Poisson a partir de una única distribución de dicéntricos, estimando el peso en estas dos distribuciones de Poisson y el porcentaje de células pertenecientes a cada distribución. En el caso de irradiaciones heterogéneas, los valores U de mezclas 1:1 con sangre irradiada a 1 y 4 Gy, y a 2 y 6 Gy cayeron en el intervalo de  $\pm 1,96$ . Sin embargo, para la mezcla de 2 y 17 Gy, la distribución de células con dicéntricos mostró una sobredispersión. De manera similar a las irradiaciones parciales, cuando se comparó la mezcla de 2 y 17 Gy entre diferentes tratamientos de

cultivo, la presencia de cafeína aumentó la proporción de células analizadas que fueron irradiadas a 17 Gy, lo que permitió el análisis de un alto número de dicéntricos.

Para todas las exposiciones parciales simuladas, cuando se consideró la frecuencia de dicéntricos en todas las células, el 95% CL de las dosis estimadas de cuerpo entero no incluyó la dosis real administrada. Por el contrario, cuando se utilizó para estimar la dosis el modelo Poisson mixto, hasta 10 Gy y para todos los tratamientos de cultivo, la dosis estimada fue muy cercana a la real y en todos los casos el 95% CL incluyó la dosis real. Después de la irradiación parcial a 17 Gy, se obtuvo la mejor evaluación de la dosis para las 57 h utilizando la curva tipo Gompertz. Para simulaciones de exposiciones heterogéneas, las dosis de cuerpo entero estimadas usando las frecuencias observadas de dicéntricos en todas las células siempre estuvieron cerca de la dosis más baja. Cuando se usó el modelo Poisson mixto para la evaluación de la dosis, el modelo distinguió dos poblaciones celulares y la dosis estimada para cada una estuvo en la mayoría de los casos cerca de la dosis real. Para las mezclas de 2 y 17 Gy se obtuvo una mejor estimación de dosis en los cultivos tratados con cafeína de 57 h. En este caso la fracción irradiada a 2 Gy fue estimada correctamente; y para la fracción irradiada a 17 Gy, el límite de confianza inferior del 90% de la dosis estimada incluyó la dosis real.

En conclusión, el modelo de Poisson Mixto presentado en este estudio permite distinguir entre exposiciones parciales y heterogéneas. Los valores estimados de las frecuencias de dicéntricos en las fracciones irradiadas, las dosis recibidas y las proporciones iniciales de sangre irradiada concordaron bien con los valores reales. Para las exposiciones parciales los valores estimados fueron similares a los obtenidos por el método de Dolphin, demostrando que ambos métodos tienen una efectividad similar. Sin embargo, para las

exposiciones heterogéneas, los resultados obtenidos indican que la reconstrucción de dosis utilizando el modelo de Poisson Mixto es más precisa que la obtenida por el método de Dolphin. Considerando que en la mayoría de los accidentes las víctimas reciben un gradiente de dosis, el modelo de Poisson Mixto dará valores más realistas. Además, la combinación del modelo de Poisson Mixto con los cultivos tratados con cafeína durante 57 h optimiza la evaluación de la dosis en casos en los que una fracción del cuerpo recibe una dosis muy alta de radiación.

## **Bibliografía**

Dolphin GW. Biological dosimetry with particular reference to chromosomal aberration analysis. A review of methods. In Handling of Radiation Accidents. STI/PUB/229 (Vienna International Atomic Energy Agency). 1969; 215–24.

Edwards AA, Lloyd DC, Purrott RJ. Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution. Radiat Environ Biophys. 1979; 16: 89–100.

International Atomic Energy Agency. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Technical . Vienna; 2011.

Liu Q, Jiang B, Jiang LP, Wu Y, Wang XG, Zhao FL, et al. Clinical report of three cases of acute radiation sickness from a  $^{60}\text{Co}$  radiation accident in Henan Province in China. J Radiat Res. 2008; 49:63–9.

McLachlan GJ, Peel D. Finite Mixture Models, John Wiley & Sons, Inc; 2000.

Pujol M, Barquinero JF, Puig P, Puig R, Caballín MR, Barrios L. A new model of biodosimetry to integrate low and high doses. PLoS One. 2014; 9:e114137.

Pujol M, Puig R, Caballín MR, Barrios L, Barquinero JF. The use of caffeine to assess high dose exposures to ionising radiation by dicentric analysis. *Radiat Prot Dosimetry*. 2012; 149:392–8.

Sevan'kaev AV, Lloyd DC, Edwards AA, Mikhailova GF, Nugis VY. Protracted overexposure to a Cs source: Dose reconstruction. *Radiat. Prot. Dosimetry*. 1999; 81:85–90.

Sevan'kaev AV, Lloyd DC, Edwards AA, Moquet JE, Nugis VY, Mikhailova GM, et al. Cytogenic investigations of serious overexposures to an industrial gamma radiography source. *Radiat Prot Dosimetry*. 2002; 102:201–6.

Sreedevi B, Rao BS, Bhatt B. Radiation-induced chromosome aberration yields following an accidental non-uniform exposure. *Radiat Prot Dosimetry*. 1993; 50:45–9.

### **Agradecimientos:**

Este trabajo ha recibido apoyo financiero del Consejo de Seguridad Nuclear.