



# Modelo experimental de tratamiento "in vitro" del Tramp-c1 (adenocarcinoma de próstata de ratón transgénico) con radiaciones ionizantes y cisplatino

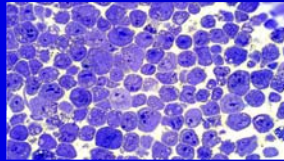


<sup>1</sup>De la Fuente, I.; <sup>3</sup>Álvarez, N.; <sup>3</sup>Ortiz, L.; <sup>3</sup>Vicente, V.; <sup>4</sup>Armero, D. <sup>2</sup>Alcaraz, M.

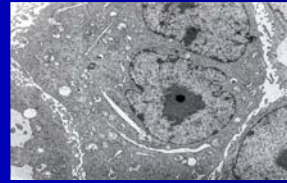
<sup>1</sup>Oncología Radioterápica. Hospital "Virgen de la Arrixaca", 30100-El Palmar (Murcia). Departamentos de <sup>2</sup>Radiología y Medicina Física, <sup>3</sup>Anatomía Patológica y <sup>4</sup>Enfermería. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. 30100-Campus de Espinardo. Murcia.

## OBJETIVO

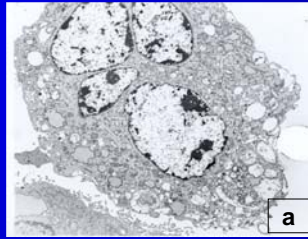
Comparar los efectos citotóxicos de la Rx, individualmente y en combinación con el cisplatino sobre el adenocarcinoma de próstata de ratón transgénico tramp-c1 en un modelo experimental "in vitro".



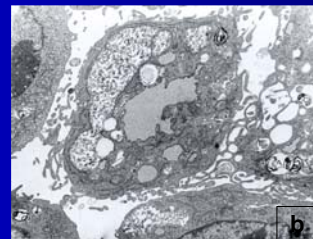
TRAMP-C1. Sección semifina. 200X



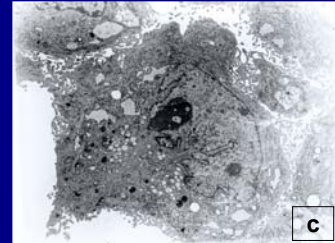
Tramp-C1 Sección ultrafina MET 3100X.



a



b



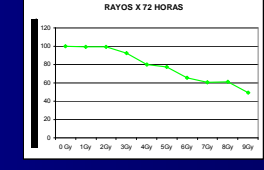
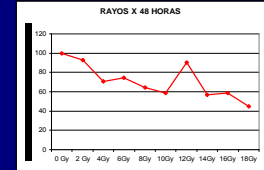
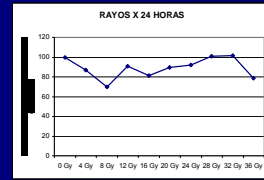
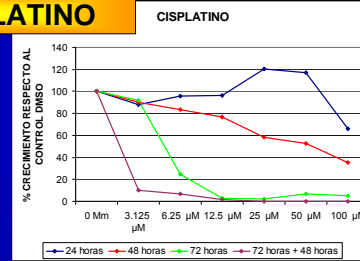
c

TRAMP-C1. Post-tratamiento. Secciones ultrafinas: a)5000X; b) 6000X; c) 4500X

## MATERIAL Y METODO

Usamos cisplatino (Sigma): 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125  $\mu$ M durante 24, 48, 72 horas. Irradiamos con distintas intensidades de Rx y las mantuvimos en cultivo durante 24, 48 y 72 horas. Combinamos el cisplatino (12.5 y 25  $\mu$ M) con Rx 4 y 8 Gy para los ensayos a 24 y 48 horas, y 2, 4, 6 y 8 Gy para el ensayo a 72 horas.

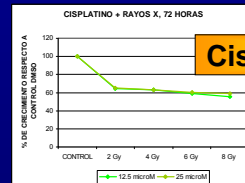
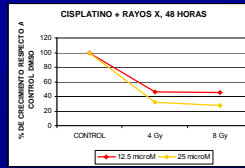
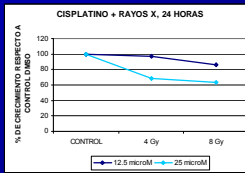
## CISPLATINO



## Rayos X

## RESULTADOS

		Concentración/Dosis de max inhibición del crecimiento	% inhibición del crecimiento respecto al control
Cisplatino	24h	100 $\mu$ M	34%
	48h	100 $\mu$ M	65%
	72h	6.25 $\mu$ M	97%
Rx	24h	8Gy	30%
	48h	18Gy	45%
	72h	9Gy	50%
Cisplatino/Rx	24h	12.5 $\mu$ M / 8Gy	14%
	48h	12.5 $\mu$ M / 4 Gy	54.5%
	72h	Cualquiera/ 2Gy	35%



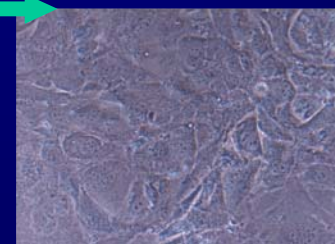
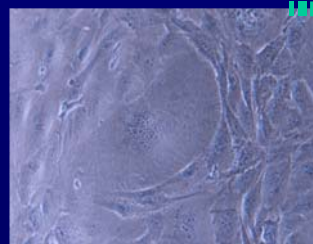
## Cisplatino + Rayos X

## CONCLUSIÓN

- La exposición a dosis pequeñas y moderadas de Rx produce inhibición del crecimiento y de la proliferación celular.
- Con el cisplatino a dosis bajas conseguimos inhibición de la proliferación cuando la sustancia ha actuado durante cierto tiempo.
- Existe un efecto sinérgico en el uso combinado de cisplatino y Rx que intensifica el efecto inhibitor del crecimiento y la proliferación celular mayor del esperado, sobre todo a dosis bajas

Adenocarcinoma TRAMP-C1

TRAMP-C1 con Cisplatino





# EFFECTO PROTECTOR "IN VIVO" DE EXTRACTOS POLIFENÓLICOS FRENTE AL DAÑO CROMOSÓMIO INDUCIDO POR RAYOS X.

<sup>1</sup>Alcaraz Baños, M.; <sup>1</sup>Acevedo Alcaraz, C.; <sup>1</sup>Martín Gil, R.; <sup>4</sup>de las Heras, M; <sup>4</sup>de la Fuente. I.; <sup>2</sup>Vicente Ortega, V.; <sup>5</sup>Castillo, J.; <sup>5</sup>Benavente, O. y <sup>3</sup>Canteras Jordana, M.

<sup>1</sup>Cátedras de Radiología y Medicina Física, <sup>2</sup>Patología y <sup>3</sup>Bioestadística de la Universidad de Murcia. <sup>4</sup>Servicio de Oncología Radioterápica C.S.Virgen de la Arrixaca de Murcia. <sup>5</sup>Departamento de Investigación y Desarrollo, Furfural Español, SA. Alcantarilla (Murcia)

## INTRODUCCIÓN

El test de micronúcleos "in vivo" es un método descrito originariamente para la detección de alteraciones cromosómicas provocadas por sustancias químicas. Las sustancias se administran a pequeños roedores, y su efecto se analiza directamente sobre preparaciones microscópicas de su médula ósea. El ensayo de micronúcleos sobre eritrocitos policromatófilos de médula ósea (PCEs) desarrollado por Schmidt (1975), es probablemente el test más utilizado en el estudio genotóxico a corto plazo realizado "in vivo". El análisis de micronúcleos sobre PCEs es un método simple para la detección del daño cromosómico producido por agentes químicos y físicos (Heddle y Salamone, 1981; Almasy et al., 1987; Mavournin et al., 1990; Krishna et al., 1992; Mazur, 1995), y es probablemente el test más significativo en términos de riesgo humano (Ashby et al., 1997).

## OBJETIVO

Determinar un posible efecto protector de diferentes preparados de procianidinas frente al daño genotóxico inducido "in vivo" por rayos X, mediante el test de micronúcleos en médula ósea de ratón.

## MATERIAL Y METODO

**Animales:** Ratoness Swiss machos (9-12 semanas de edad) con un peso de 25-30 g se han alimentado con una dieta standard (Rodent toxicology diet<sup>®</sup> BYK Universal, Francia) y agua "ad libitum". Cada punto experimental corresponde a los resultados de 6 animales.

**Sustancias y Tratamiento:** Los extractos polifenólicos se han administrado oralmente. Todas las preparaciones se han preparado inmediatamente antes de la administración a los animales: Extracto de Uva (Procianidinas (Pn)), Extracto cítrico (CE), Extracto de Oliva (OL), el ácido ascórbico (AA) y 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) se han disuelto al 0.2% en el agua de bebida administrados durante los cinco días previos a la irradiación. El DMSO se ha disuelto en agua (50 g/100 ml). La diosmina y la rutina se han disuelto en DMSO (300 mg/ml). DMSO, diosmina y rutina se han inyectado directamente en la luz gástrica tras la intubación esofágica con una dosis única de 0.6 ml 6h antes de la irradiación.

**Exposición a rayos X:** La exposición de los animales se ha realizado por exposición corporal total utilizando un aparato CGR con radioscopia (General Electric, España) con 120 kV, 1.4 mA, filtro 2.5 mm Al, rendimiento de 2 cGy/min, FOD 100 cm. Los ratones se han expuesto a una dosis única de 48 cGy. La dosis utilizada se ha determinado utilizando dosimetría de termoluminiscencia (TLDs) (GR-200<sup>®</sup> Conqueror Electronics Technology Co.Ltd, China).

**Test de Micronúcleos:** El test de micronúcleos sobre PCEs de médula ósea se ha realizado utilizando la técnica descrita por Schmidt (1975). Los dos fémures de cada animal se han diseccionado 24 h después de la irradiación y las células de la médula ósea se han obtenido por lavado con suero calcico fetal, se han dispersado, centrifugado y resuspendido posteriormente. Las preparaciones se han teñido con May-Grünwald/Giemsa. El número de eritrocitos policromatófilos micronucleados (MNPCEs) sobre 2000 PCEs se ha determinado por animal. La ratio de PCEs/Eritrocitos Totales (eritrocitos policromatófilos + normocromatófilos) también se ha establecido para determinar el efecto tóxico de las sustancias ensayadas. Las diferencias en la frecuencia de aparición de MNPCEs/1000 PCEs y PCEs por 1000 eritrocitos (PCEs + NCEs) se han sometido al análisis de varianza.

## RESULTADOS

Los resultados ponen de manifiesto una reducción significativa de los MNPCEs/1000 PCEs con todas las sustancias ensayadas, siendo mayor con los tres tipos de procianidinas utilizadas (p<0,001).

## CONCLUSIÓN

Las procianidinas ensayadas (flavonas-3 ols) del Extracto de Uva muestran un mayor efecto protector frente al daño cromosómico inducido por los rayos X, posiblemente por su capacidad "eliminadora" de radicales libres.

### Material y método

- Swiss 9 semanas, 30 gr de peso.
- Exposición corporal total.
- Aparato convencional CGR.
- Características: 120 kV, 1.4 mA, 2.5 mm Al, FOD 100 cm, 2 cGy/min, dosis total de 48 cGy.

### Material y método

Exposición.

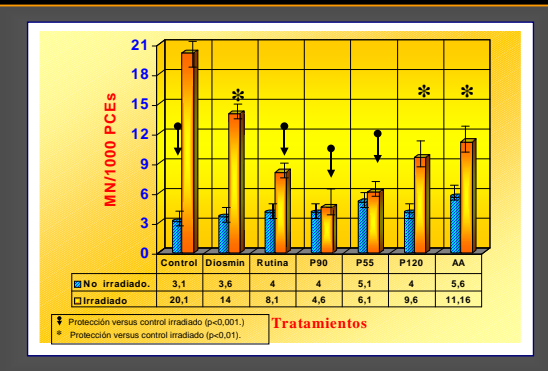
TLDs

Control de la exposición.

### Material y método

Test de micronúcleos en médula ósea de ratón (Schmidt, 1975).

Extracción del fémur.

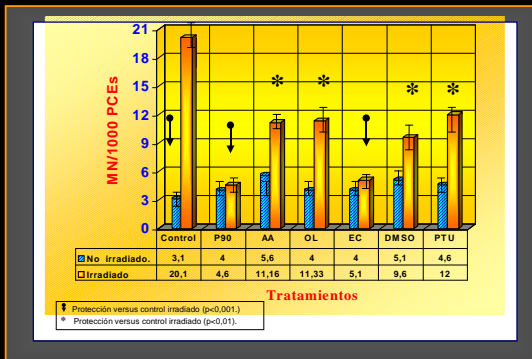


### Material y método

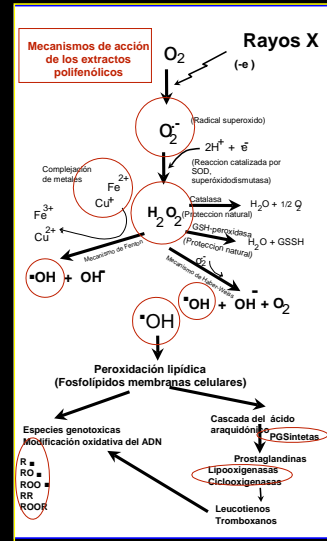
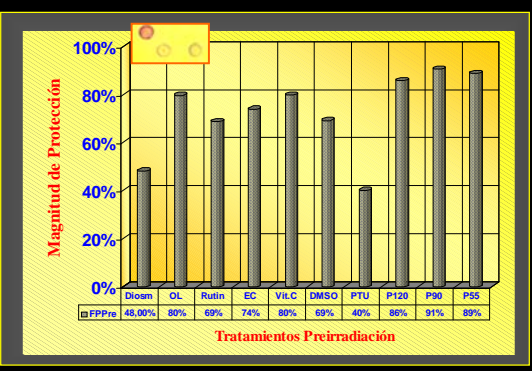
Extracción de la médula ósea.

### Material y método

Realización del frotis de médula ósea.



### RESULTADOS MORFOLÓGICOS



Magnitud de protección (%) = ((F<sub>control</sub> - F<sub>tratado</sub>) / F<sub>control</sub>) x 100.  
Donde F<sub>control</sub> = frecuencia de MNPCEs en animales irradiados.  
F<sub>tratado</sub> = frecuencia de MNPCEs en animales tratados antes de la irradiación con rayos X.



# EFFECTO PROTECTOR "IN VIVO" DE EXTRACTOS POLIFENÓLICOS FRENTE AL DAÑO CROMOSÓMIO INDUCIDO POR RAYOS X.

<sup>1</sup>Alcaraz Baños, M.; <sup>1</sup>Acevedo Alcaraz, C.; <sup>1</sup>Martín Gil, R.; <sup>4</sup>de las Heras, M; <sup>4</sup>de la Fuente. I.; <sup>2</sup>Vicente Ortega, V.; <sup>5</sup>Castillo, J.; <sup>5</sup>Benavente, O. y <sup>3</sup>Canteras Jordana, M.

<sup>1</sup>Cátedras de Radiología y Medicina Física, <sup>2</sup>Patología y <sup>3</sup>Bioestadística de la Universidad de Murcia. <sup>4</sup>Servicio de Oncología Radioterápica C.S.Virgen de la Arrixaca de Murcia. <sup>5</sup>Departamento de Investigación y Desarrollo, Furfural Español, SA. Alcantarilla (Murcia)

## INTRODUCCIÓN

El test de micronúcleos "in vivo" es un método descrito originariamente para la detección de alteraciones cromosómicas provocadas por sustancias químicas. Las sustancias se administran a pequeños roedores, y su efecto se analiza directamente sobre preparaciones microscópicas de su médula ósea. El ensayo de micronúcleos sobre eritrocitos policromatófilos de médula ósea (PCEs) desarrollado por Schmidt (1975), es probablemente el test más utilizado en el estudio genotóxico a corto plazo realizado "in vivo". El análisis de micronúcleos sobre PCEs es un método simple para la detección del daño cromosómico producido por agentes químicos y físicos (Heddle y Salamone, 1981; Almasy et al., 1987; Mavournin et al., 1990; Krishna et al., 1992; Mazur, 1995), y es probablemente el test más significativo en términos de riesgo humano (Ashby et al., 1997).

## OBJETIVO

Determinar un posible efecto protector de diferentes preparados de procianidinas frente al daño genotóxico inducido "in vivo" por rayos X, mediante el test de micronúcleos en médula ósea de ratón.

## MATERIAL Y METODO

**Animales:** Ratoness Swiss machos (9-12 semanas de edad) con un peso de 25-30 g se han alimentado con una dieta standard (Rodent toxicology diet<sup>®</sup> BYK Universal, Francia) y agua "ad libitum". Cada punto experimental corresponde a los resultados de 6 animales.

**Sustancias y Tratamiento:** Los extractos polifenólicos se han administrado oralmente. Todas las preparaciones se han preparado inmediatamente antes de la administración a los animales: Extracto de Uva (Procianidinas (Pnn)), Extracto cítrico (CE), Extracto de Oliva (OL), el ácido ascórbico (AA) y 6n-propyl-2-thiouracil (PTU) se han disuelto al 0.2% en el agua de bebida administrados durante los cinco días previos a la irradiación. El DMSO se ha disuelto en agua (50 g/100 ml). La diosmina y la rutina se han disuelto en DMSO (300 mg/ml). DMSO, diosmina y rutina se han inyectado directamente en la luz gástrica tras la intubación esofágica con una dosis única de 0.6 ml 6h antes de la irradiación.

**Exposición a rayos X:** La exposición de los animales se ha realizado por exposición corporal total utilizando un aparato CGR con radioscopia (General Electric, España) con 120 kV, 1.4 mA, filtro 2.5 mm Al, rendimiento de 2 cGy/min, FOD 100 cm. Los ratones se han expuesto a una dosis única de 48 cGy. La dosis utilizada se ha determinado utilizando dosimetría de termoluminiscencia (TLDs) (GR-200 • Conqueror Electronics Technology Co.Ltd, China).

**Test de Micronúcleos:** El test de micronúcleos sobre PCEs de médula ósea se ha realizado utilizando la técnica descrita por Schmidt (1975). Los dos fémures de cada animal se han diseccionado 24 h después de la irradiación y las células de la médula ósea se han obtenido por lavado con suero calcico fetal, se han dispersado, centrifugado y resuspendido posteriormente. Las preparaciones se han teñido con May-Grünwald/Giemsa. El número de eritrocitos policromatófilos micronucleados (MNPCEs) sobre 2000 PCEs se ha determinado por animal. La ratio de PCEs/Eritrocitos Totales (eritrocitos policromatófilos + normocromatófilos) también se ha establecido para determinar el efecto tóxico de las sustancias ensayadas. Las diferencias en la frecuencia de aparición de MNPCEs/1000 PCEs y PCEs por 1000 eritrocitos (PCEs + NCEs) se han sometido al análisis de varianza.

## RESULTADOS

Los resultados ponen de manifiesto una reducción significativa de los MNPCEs/1000 PCEs con todas las sustancias ensayadas, siendo mayor con los tres tipos de procianidinas utilizadas (p<0,001).

### Material y método

- Swiss 9 semanas, 30 gr de peso.
- Exposición corporal total.
- Aparato convencional CGR.
- Características: 120 kV, 1.4 mA, 2.5 mm Al, FOD 100 cm, 2 cGy/min, dosis total de 48 cGy.

### Material y método

Exposición.

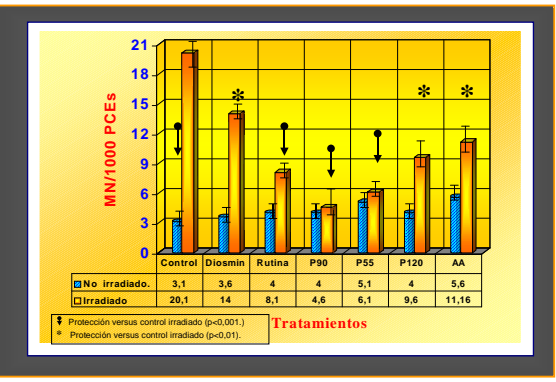
TLDs

Control de la exposición.

### Material y método

Test de micronúcleos en médula ósea de ratón (Schmidt, 1975).

Extracción del fémur.

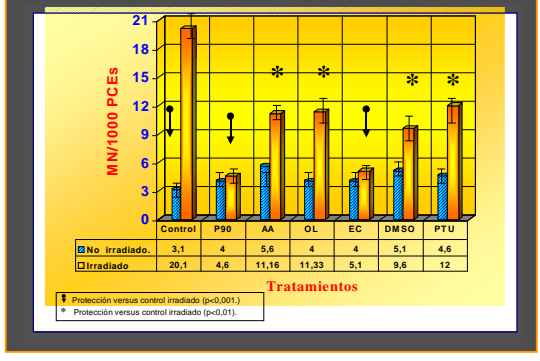


### Material y método

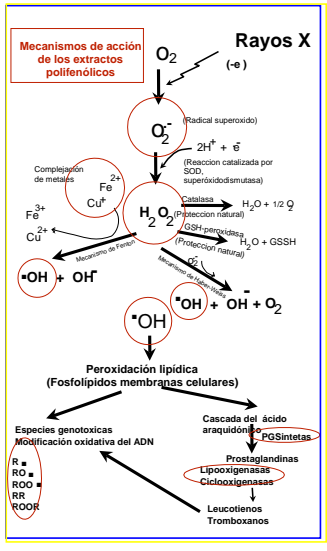
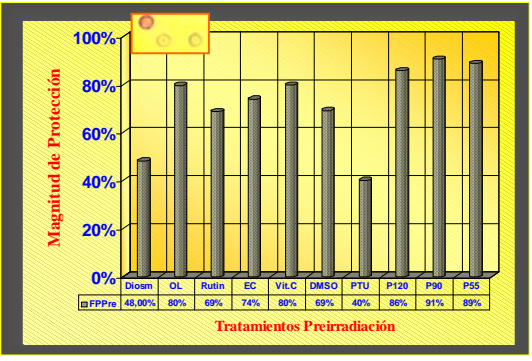
Extracción de la médula ósea.

### Material y método

Análisis del frotis de médula ósea.



### RESULTADOS MORFOLÓGICOS



## CONCLUSIÓN

Las procianidinas ensayadas (flavonas-3 ols) del Extracto de Uva muestran un mayor efecto protector frente al daño cromosómico inducido por los rayos X, posiblemente por su capacidad "eliminadora" de radicales libres.

Magnitud de protección (%) = ((F<sub>control</sub> - F<sub>tratado</sub>) / F<sub>control</sub>) x 100.  
Donde F<sub>control</sub> = frecuencia de MNPCEs en animales irradiados.  
F<sub>tratado</sub> = frecuencia de MNPCEs en animales tratados antes de la irradiación con rayos X.

Los animales empleados en esta investigación se han mantenido y utilizado según las condiciones éticas recogidas en Biological Council Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific Investigations.



# DOSIS DE RADIACIÓN AL PACIENTE DURANTE DIFERENTES PROCEDIMIENTOS ANGIOGRÁFICOS



Armero Barranco, D<sup>1</sup>; Bernal Páez, F.L<sup>2</sup>; Alcaraz Baños, M.<sup>3</sup>; Felices Abad, J.M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Enfermería. Escuela Universitaria de Enfermería. Universidad de Murcia. <sup>2</sup>Unidad de Radiología Vascolar e Intervencionista del Hospital General Universitario de Murcia. <sup>3</sup>Área de Radiología y Medicina Física. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia.

## INTRODUCCIÓN

Con el desarrollo y generalización durante los últimos años, de los procedimientos diagnósticos y terapéuticos en Radiología Vascolar e Intervencionista, se ha extendido el uso de las radiaciones ionizantes en los pacientes que ingresan en los hospitales. Los procedimientos angiográficos intervencionistas, son cada vez de mayor complejidad, representando para los pacientes, la administración de mayores dosis de radiación. La determinación de las dosis de radiación administrados a estos pacientes es lo que ha impulsado a la realización del trabajo presentado



Fig. 1: Control radiológico de la introducción de la guía a través del esófago y estómago.

## OBJETIVOS

[Empty box for objectives]

## MATERIAL Y METODO

Se han recogido los datos dosimétricos de 92 pacientes a los que se les han realizado procedimientos, diagnósticos o terapéuticos, en Radiología Vascolar e Intervencionista. Los estudios se han realizado con un angiógrafo de sustracción digital (DSA) (Philipps, BV300). Las dosis administradas se han leído directamente del propio aparato (Gy/cm<sup>2</sup>) al finalizar el procedimiento radiológico.

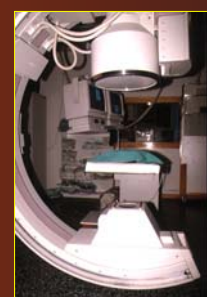
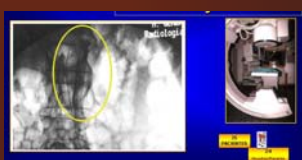


Fig. 2.: Diferentes momentos en la colocación de la sonda yeyunal: 2.1) Guía dentro del esófago deslizándose hasta el estómago; 2.2) Catéter que sigue a su guía hasta el estómago; 2.3) y 2.4) Introducción de contraste para visualizar las asas intestinales; 2.5) y 2.6) Sonda definitiva desplazándose sobre una guía rígida hasta llegar a su ubicación.

## RESULTADOS

A continuación se exponen los resultados obtenidos. Se han recogido 92 exploraciones en pacientes en que la mayoría eran hombres (65 hombres frente a 31 mujeres), con edades comprendidas entre los 19 y 85 años (media de 57'3)



**Material y método**

FLDS

Rayos X

RADIOGRÁFICO

92 PACIENTES

Fig. 3: Control radiológico de la sonda en distintos momentos del procedimiento: 3.1) Sonda situada en esófago; 3.2) Sonda en duodeno proximal; 3.3) Emplazamiento final de la sonda en yeyuno.

## CONCLUSIÓN

En general, las mayores dosis se administran en los procedimientos terapéuticos que en los diagnósticos, salvo con la implantación de catéteres Hickman que supone las dosis más bajas administradas. Los procedimientos con mayores dosis son el caso del diagnóstico y embolización de varices ováricas, seguido por la angioplastia de miembros inferiores y la terapéutica cardiaca. Es importante contemplar el hecho de que existen dos factores determinantes a la hora de analizar las dosis de radiación que recibe un paciente: por un lado, las dificultades técnicas que pueda entrañar el procedimiento y por otro lado el grado de pericia-experiencia que tenga el personal encargado de la realización de la prueba.

EXPLORACIÓN	Nº CASOS	Nº DE SERIES	TIEMPO FLUORO (Minutos)	DOSIS (Gy/cm <sup>2</sup> )
Arterioarteriografía MMII	30	8-67 (media: 14)	3'37-76'26 (media:8'28)	8'04-72'4 (media: 19)
Flebografía de I MI	12	23-46 (media: 30)	4'36-9'2 (media: 6'51)	2'38-17'9 (media: 7'5)
Flebografía de MMII	1	46	12'3	9'92
Coronarografía +ventriculograma	14	18-18 (media: 13)	2'5-15'4 (media: 5'75)	4'51-19'9 (media: 12'2)
Coronarografía	4	11-13 (media: 12)	4'31-41 (media: 10'56)	8'95-27'6 (media: 16'7)
Arteriografía MMSS	3	16-17 (media: 16)	11'56-13'4 (media: 12'3)	4'94-9'16 (media: 6'9)
Coronarografía + ACFP+ 1 stent	5	11-46(media: 30)	8'6-18'53 (media: 12'16)	14'26-58 (media: 39'3)
Coronarografía +ACFP + 2 stent	4	18-49 (media: 32)	12'1-17'14 (media: 13'5)	17'45'7 (media: 43'5)
Arteriografía carótido-vertebral	3	8-20 (media: 13)	9'31-15'53 (media: 14)	7'36-20'8 (media: 15'2)
Angioplastia de MMII	6	22-56 (media: 37)	16'2-99'5 (media: 45'2)	16'2-127 (media: 60)
Arteriografía abdominal	3	15-23 (media: 18)	8'17-42'33 (media: 22'6)	25'9-117 (media: 67)
Flebografía + embolización ovárica	1	25-44 (media: 36)	5'27-75'5 (media: 37'6)	102-165 (media: 133)
Colocación catéter doble "J"	3	11-12 (media: 12)	4'7-23'57 (media: 15'55)	9'75-58'3 (media: 32'5)
Colocación catéter Hickman	2	2-4 (media: 3)	2'31-2'55 (media: 2'43)	2'57-2'76 (media: 2'16)

# GENOTOXIC EFFECT OF IONISING RADIATION USED IN DIFFERENT RADIOLOGY AND NUCLEAR MEDICINE PROCEDURES.



M. Alcaraz<sup>1</sup>, J.L. Navarro<sup>1</sup>, C. Acevedo<sup>1</sup>, V. Vicente<sup>2</sup> and M. Canteras<sup>3</sup>.



<sup>1</sup>Department of Radiology and Physical Medicine, <sup>2</sup>Pathology and <sup>3</sup>Biostatistics. University of Murcia. 30100-Espinardo, Murcia, Spain (mab@um.es)

## INTRODUCTION

The cytokinesis-blocked (CB) micronucleus test (MN) on irradiated human lymphocytes is normally used to evaluate chromosomal and genotoxic damage produced by various physical and chemical agents.

## OBJECTIVE

Determine any possible genotoxic effect induced by the various types of ionising radiation employed in medical diagnostic radiology and nuclear medicine.

## MATERIALS AND METHODS

The MN appearance frequency was determined in CB lymphocyte cultures of a total of 5 different groups of patients: (1) in 35 supposedly healthy volunteers to establish the MN spontaneous frequency in the medium; (2) in 9 volunteers to measure the in vitro dose-response curves in order to calculate the MN frequency following X-ray and gamma radiation; (3) in 25 patients in whom a specific diagnostic and/or therapeutic procedure employing diagnostic radiology techniques involving X-ray exposure was applied, (4) in 26 patients in whom the diagnostic procedure in question involved nuclear medicine techniques (scintiscan) and (5) in 25 patients who have received an ablative dose of I-131 in the treatment of a thyroid carcinoma.

## RESULTS

A lineal relationship is observed between the MN frequency and the dose of ionising radiation administered in vitro, both in X-rays and gamma radiation. A significant increase in the MN is appreciated following the radiation imparted to patients during medical diagnostic radiology examinations when compared with the control values obtained from the same patients prior to being submitted to the radiological procedure ( $p < 0.01$ ). The frequency of MN after the treatment with I-131 (8.89 MN/500CB) has doubled the basal frequency obtained before the treatment (4.08/500MN) ( $p < 0.001$ ). The equivalent dose of whole body radiation (WBED) involved in this treatment is 13 cGy during the first three days from the therapeutic administration of I-131. No significant MN increase is appreciated following exposure to radiation involved in diagnostic examinations in patients under nuclear medicine.

## CONCLUSION

The ionising radiation employed in complex medical diagnostic radiology examinations produces a significant increase in the MN appearance frequency and as such indicates both chromosomal and genotoxic damage induced by radiation. However, the ionising radiation used in diagnostic nuclear medicine examinations does not induce any significant increase in the MN appearance frequency.

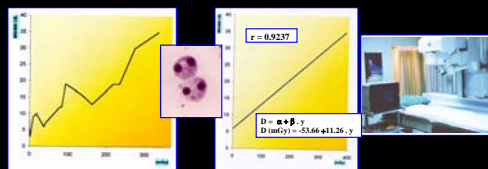


Fig. 1: Dose-effect curves for X-ray induced micronuclei (MN/500 CB) (0-335 mGy).

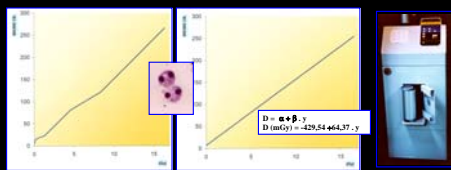


Fig. 2: Dose-effect curves for gamma-irradiation induced micronuclei (MN/500 CB) (0-16'362 Gy).

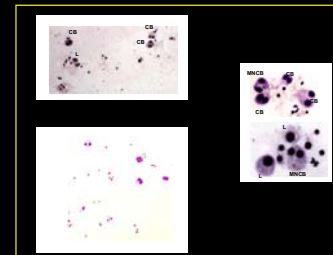


Fig. 3: Photomicrographs of different micronuclei preparations (CB: binucleated cells (cytokinesis-blocked cell); MN/CB: binucleated blocked-cells with micronuclei; L: lymphocyte).

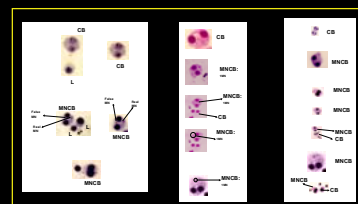


Fig. 4: Structural micronuclei: different cytochalasin blocked cells (CB: binucleated cells (cytokinesis-blocked cell); MN/CB: binucleated blocked-cells with micronuclei; L: lymphocyte).

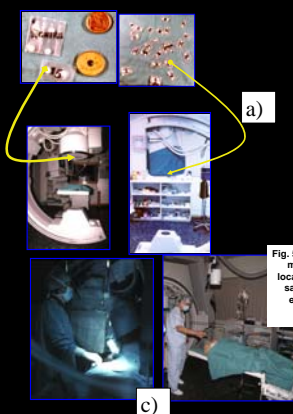
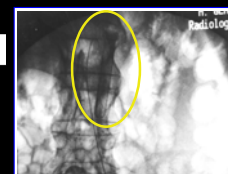
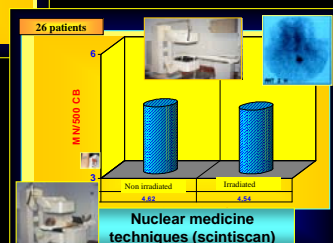
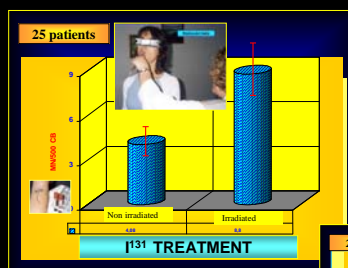


Fig. 5: Different aspects of X-irradiation during medical radiodiagnostic exploration: a) localization of TLDs dosimeters; b) detail of sample exposed throughout radiological exploration (sample III); c) radiological exploration.



Code	Age (years)	Sex	EXPLORATION	Number	Cells (CB) scored	PREIRRADIATION				POSTIRRADIATION				Dose (mGy)		
						Cells without MN	Cells with MN	Micronuclei distribution (cell/CB) (1/500) (2/500) (3/500)	Σ	Cells (CB) scored	Cells with MN	Micronuclei distribution (cell/CB) (1/500) (2/500) (3/500)	Σ			
1	21	M	Anteroposterior of mammogram	Yes	500	497	3	3	3	500	497	3	3	3	6.58	
2	26	M	Anteroposterior of mammogram	No	500	497	3	3	3	500	496	4	3	1	5.38	
3	41	M	Contrary angiography	Yes	500	496	4	4	4	500	489	11	10	2	17.32	
4	42	M	Anteroposterior	No	500	496	4	4	4	500	497	3	3	3	4.24	
5	46	M	Contrary mammography	No	500	497	3	3	3	500	496	4	4	4	6.48	
6	48	M	Anteroposterior	Yes	500	498	2	2	2	500	498	2	2	2	4.77	
7	50	M	Contrary angiography	Yes	500	496	4	4	4	500	495	5	5	5	4.28	
8	50	M	Anteroposterior	Yes	500	497	3	3	3	500	496	4	4	4	4.21	
9	50	M	Contrary angiography	Yes	500	496	4	4	4	500	494	6	5	1	9.45	
10	53	M	Anteroposterior of mammogram	No	500	495	5	5	5	500	496	4	2	1	9.63	
11	54	M	Anteroposterior of mammogram	Yes	500	496	4	4	4	500	493	7	6	1	8.15	
12	54	M	Posteroanterior cholangiography	Yes	500	491	9	7	2	11	500	492	7	5	2	9.49
13	54	M	Contrary angiography	No	500	498	2	2	2	500	495	5	4	1	6.46	
14	60	M	Contrary angiography	Yes	500	497	3	3	3	500	493	7	5	2	9.45	
15	60	M	Contrary angiography	Yes	500	484	6	5	1	7	500	490	10	7	1	15.73
16	62	M	Contrary angiography	No	500	489	11	11	11	11	500	491	9	9	9	2.10
17	64	M	Contrary angiography	No	500	489	11	10	1	12	500	486	14	14	7	20.32
18	64	M	Posterior angiography	No	500	493	7	7	7	7	500	492	8	6	2	10.26
19	66	M	Cholangiography standard	Yes	500	492	8	6	2	10	500	490	10	10	10	13.97
20	67	M	Contrary angiography	No	500	479	21	19	2	23	500	485	15	14	1	16.18
21	68	M	Contrary angiography	No	500	488	12	12	12	12	500	484	16	14	2	18.40
22	72	M	Endoprostheses	No	500	490	10	10	10	10	500	490	10	7	3	13.20
23	77	M	Angiography	Yes	500	492	8	7	1	10	500	490	10	10	10	4.10
24	82	M	Head anteroposterior	No	500	493	7	7	7	7	500	492	5	5	5	6.71
25	84	M	Anteroposterior	No	500	487	13	13	13	13	500	492	5	4	1	6.10

Fig. 7: Number of micronuclei (MN) in binucleated cells (BN) and distribution of BN presenting one or more micronuclei in the patients irradiated during medical radiodiagnostic exploration (Pre-irradiation: sample I; Post-irradiation: sample IV).





# EFFECT OF RADIATION ON THYROID PEROXIDASE ACTIVITY IN RABBIT.



M. Alcaraz<sup>1</sup>, F. Solano<sup>2</sup>, V. Vicente<sup>3</sup>, M. Canteras<sup>4</sup>.



<sup>1</sup>Radiology and Physical Medicine Department; <sup>2</sup>Biochemistry and Molecular Biology Department, <sup>3</sup>Pathology Department and <sup>4</sup>Biostatistical Department. Faculty of Medicine. University of Murcia. 30100—Murcia, Spain.

## INTRODUCTION

Some studies show that the thyroid function decreases following external radiation of the thyroid gland with doses as used on human patients (Holten, 1983) and with a similar fractioning of doses in experimental studies (Alcaraz et al., 1988). It has been suggested that this functional decrease is due to immediate cellular death and lesion of the enzyme systems of the radiation-induced surviving cells (Holten, 1983). However, there are very few studies on the effect of radiation on the enzyme systems of the follicular cells.

Studies with 125-I confirm this different sensitivity of the enzyme systems and suggest that irradiation would cause changes in the enzymatic systems of the follicular cells (Gross et al., 1968; Vickery and Williams, 1971).

The guaiacol assay is the technique used by numerous authors to determine the TPO activity in normal thyroid glands and after administering to animals of different substances "in vivo" and "in vitro" (Solano et al., 1981; Engler et al., 1983; Shiroozu et al., 1983; Magnusson and Rapoport, 1985; Taurog and Dorris, 1989). The TPO activity of the thyroid glands of normofunctioning rabbits is greater to that previously described in other non-rodent mammals, such as beef (Solano et al., 1981).

## MATERIALS AND METHODS

Sixty specimens of 3-month-old New Zealand rabbits (Biocenter, Spain), weighing approximately 2,700 g at the beginning of the study and kept at 18-22 °C, an ambient humidity between 50-70% and in a 12-h day-night cycle, were fed with commercial fodder (U.A.R. 112 Panlab, Spain) and allowed water "ad libitum".

The animals were divided into four groups: - Group I: Nine animals which had received no type of treatment prior to irradiation (normofunctioning group). - Group II: Nine animals whose thyroid functional activity was reduced by administration of 6-propyl-2-thiouracil (PTU) (Sigma, USA) over the 4 weeks prior irradiation. The PTU was administered to the drinking water at a concentration of 0.2% and supplemented with 1% sucrose. - Group III: Nine animals whose thyroid functional activity was stimulated by administration of prolitelin (TRH) (Lab. Frumstot-Prém, Spain) during the week prior to irradiation. The TRH was administered intravenously, at a dose of 200 µg/8hours, through a polyethylene catheter inserted into the right external jugular vein. - Group IV: Group of 33 animals, denominated the "variable post-irradiation period group", was used to plot a response curve of thyroid peroxidase activity (TPO) at 0, 24 and 48 hours after irradiation.

The irradiation field was 5 cm in diameter upon the thyroid cartilage. The X-rays were delivered by a therapy unit (Securix 2612 Compact, CGR) with 120 kV, 12 mA, 1 mm Cu of HVL, filtration of 1 mm Cu and 0.5 mm Al, FSD 50 cm and absorbed dose rate of 1.15 Gy/min. In the first three groups, the total X-ray dose administered was 0 (as control), 10 and 20 Gy, fractionated at 2 Gy/day, on alternative days. In the fourth group, the doses administered were 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 Gy, in a single session. All the animals were immobilised and conscious during irradiation. ASSAY FOR PEROXIDASE ACTIVITY: The peroxidase activity of the thyroid preparations was tested using the guaiacol method as described by Chance and Maehly (1967) slightly modified by Solano et al., (1981). Briefly, the method consists of measuring the absorbance increase per minute, at 470 nm using a spectrophotometer and cuvettes of 1 ml total volume. The reaction mixture contained 0.9 ml of 20 mM guaiacol in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.2, 50 µl 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 50 µl of rabbit thyroid extracts. The activity units was defined as the amount of enzyme that produced an increase of an absorbance unit per minute under the assay conditions. PROTEIN DETERMINATION: The protein content of the enzymatic extracts was determined by a modified Lowry method (Hartree, 1972) using BSA as standard. Differences in the values of peroxidase activity were tested by analysis of variance.

## RESULTS

**Non-irradiated animals:** the values for TPO activity in the non-irradiated animals are shown in Figure 1. The increase in TPO activity in TRH-treated animals was 48 % compared to the non-irradiated normofunctioning animals. The drop in activity in the PTU-treated animals was 72% compared to the values presented by the normofunctioning animals. However, the present data only demonstrate significance in the fall in the TPO activity of the PTU-treated animals when compared to the other two groups; the values of the latter two groups are similar. This relation may be expressed as follows: N = TRH>PTU (p<0.01).

**Normofunctioning variable post-irradiation period group:** the values for TPO activity in the variable post-irradiation period group are shown in Figure 3. The irradiated animals presented a decrease in TPO activity, even with the lowest radiation doses (2 Gy), in the three study periods (0, 24 and 48 hours). Analysis of the statistical significance reveals that TPO activity in the irradiated animals with a post-irradiation period of 24 hours is greater than TPO activity in the irradiated animals with a post-irradiation period of 0 and 48 hours; the activities of the latter two groups (0 and 48 hours) are similar. This relation may be expressed as follows: N > N<sub>24</sub> > N<sub>0</sub> = N<sub>48</sub> (p<0.001).

**Groups irradiated with a fractioned dose and experimental modification of the thyroid function:** the values for TPO activity in these animals are shown in Figure 2. The normofunctioning animals irradiated with 10 and 20 Gy (alternative days) show a sharp decrease in TPO activity compared to that presented by the non-irradiated normofunctioning animals. This relation shows statistical significance and can be expressed as follows: N > N<sub>10</sub> = N<sub>20</sub> (p<0.05). The PTU-treated animals irradiated with 10 and 20 Gy show no significant differences in TPO activity from that presented by the non-irradiated PTU-treated animals: PTU<sub>0</sub> = TRH<sub>10</sub> = PTU<sub>20</sub>. The irradiated TRH-treated animals present a drastic fall in the TPO activity of their thyroid glands compared with the values of the non-irradiated TRH-treated animals: TRH<sub>0</sub> > TRH<sub>10</sub> = TRH<sub>20</sub> (p<0.001). In the three animal groups (normofunctioning, PTU-treated and TRH-treated), irradiation with 20 Gy shows a greater decrease in TPO activity than 10 Gy; however, these differences are not statistically significant.

## CONCLUSION

This work show that the peroxidase activity of the follicular cells decrease following external radiation of the thyroid gland with a fractioning of dosis similar to that used in human oncology.



Fig. 4: Detail of the irradiation.



Fig. 5: Detail of the thyroid gland specimen.

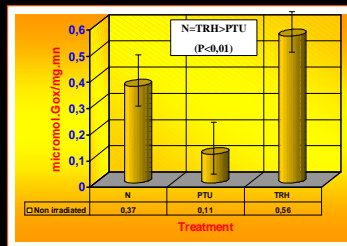


Fig. 1: Non-irradiated animals: Thyroid peroxidase activity (each point represents the determination of three animals).

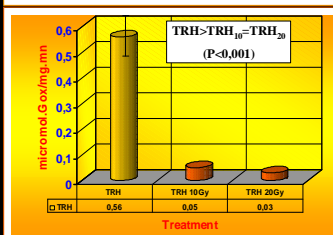
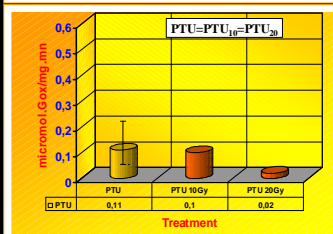
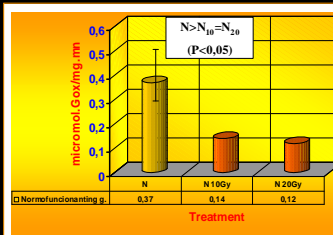


Fig. 2: Thyroid peroxidase activity in three animal groups: normofunctioning, PTU-treated and TRH-treated (each point represents the determination of three animals).

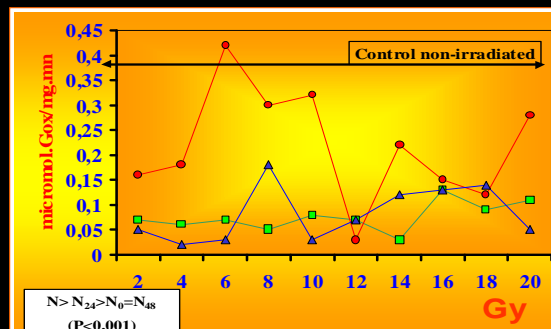


Fig. 3: Normofunctioning animals of the variable post-irradiation period: 0, 24 and 48 hours (each point represents the determination of one animal).

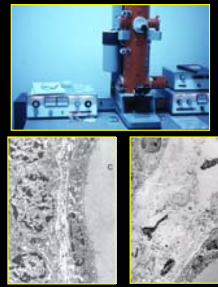


Fig. 6: Effects of radiation on rabbit thyroid gland ultrastructure. 1) follicles of the thyroid gland lined by cuboidal or squamous epithelia (N, 20 Gy) x 7.500 (C: colloid). 2) Interstitial connective tissue between two follicles (N, 20 Gy) x5000

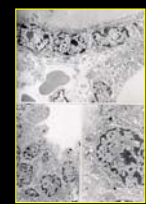


Fig. 7: Detail of a follicle consisting of two layers of follicular cells (PTU, 20 Gy) x5.000



Fig. 8: 1) Detail of the glandular interstitium showing abundant ground substance collagen bundles and loculi of low-electrodense material (TRH, 10 Gy) x 4.000. 2) Note the cytoplasmic vacuolization of the follicular cells (TRH, 10Gy) X 5.000.

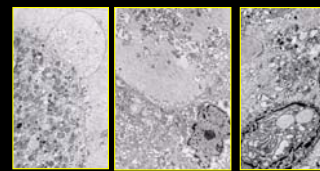


Fig. 9: Sparse short microvilli in the apical zone of a follicular cell. Cells debris of atoughed follicular cell can be seen into the follicular cavity (N, 20 Gy) x 6.300.



# EFFECTO DE LA TERAPIA CON I<sup>131</sup> SOBRE LA INDUCCIÓN DE MICRONUCLEOS EN LINFOCITOS DE PACIENTES IRRADIADOS POR CARCINOMA DE TIROIDES.



**Alcaraz M\*, Navarro JL\*\*, Rosa B\*, Acevedo C\*, Dato MJ\*, Vicente V\*\*\*, Canteras M\*\*\*\* y Claver MA \*\*.**

\*Departamento de Radiología y Medicina Física, \*\*Anatomía Patológica, \*\*\*Bioestadística. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. \*\*Departamento de Medicina Nuclear, Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca" Murcia. España. Tel: 968 363601; Fax: 968 364150; E-mail: mab@um.es.

## INTRODUCCIÓN

El test de los micronúcleos (MN) con bloqueo citogenético (CB) descrito por Fenech (1983) se utiliza para valorar el daño cromosómico (genotóxico) inducido por agentes químicos y físicos.

## OBJETIVO

Valorar el efecto genotóxico de la terapia con I<sup>131</sup> en pacientes con cáncer de tiroides y determinar la dosis equivalente corporal total (DECT) que puede suponer dicho tratamiento radiológico.

## MATERIAL Y METODO.

Se ha determinado la frecuencia de aparición de micronúcleos (MN) en cultivos de linfocitos con bloqueo citogenético (CB) mediante la técnica descrita por Fenech y Morley (1983) en cuatro grupos de individuos diferentes: 1) en 30 voluntarios para establecer la frecuencia espontánea de aparición de MN; 2) en 9 voluntarios supuestamente sanos para realizar las curvas dosis-efecto tanto para radiación gamma (rango de dosis entre 0-16 Gy) como para rayos X (rango de dosis entre 0-335 mGy); 3) En 25 pacientes a los que se les ha realizado algún tipo de procedimiento radiológico complejo; 4) En 13 pacientes (1 varón/12 mujeres) con una media de edad de 49 años (rango entre 18-67 años) y que han recibido una dosis ablativa de 100 mCi de I<sup>131</sup> en el tratamiento de un carcinoma de tiroides (9 papilares, 3 foliculares, 1 medular). Se ha determinado el número de MN/500 CB previo al tratamiento y tres días después de la administración del I<sup>131</sup>. La DECT tras la terapia con I<sup>131</sup> se ha calculado por el número de MN en sangre del paciente tras tres días de administración y comparada con la dosis de radiación X y gamma expuestas "in vitro" que produciría una idéntica frecuencia de MN.

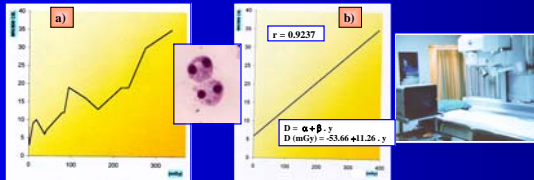


Fig. 1: Curva Dosis-Efecto para la inducción de micronúcleos por exposición a rayos X "in vitro" (MN/500 CB) (0-335 mGy): a) curva obtenida; b) curva esperada.

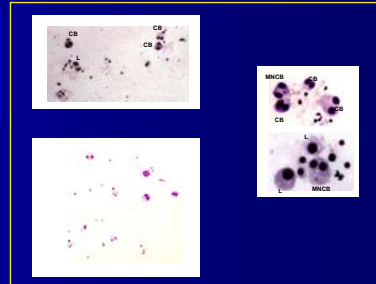


Fig. 3: Presentación de los micronúcleos en linfocitos humanos irradiados en diferentes preparaciones microscópicas (CB: células binucleadas (cytokinesis-blocked cell); MN/CB: células binucleadas con micronúcleos; L: linfocito).

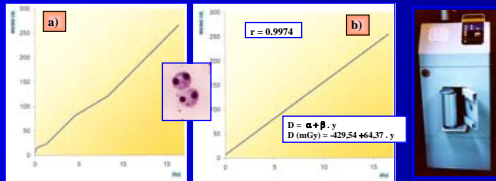


Fig. 2: Curva Dosis-Efecto para la inducción de micronúcleos por exposición a radiación gamma "in vitro" (MN/500 CB) (0-16.362 Gy): a) curva obtenida; b) curva esperada.

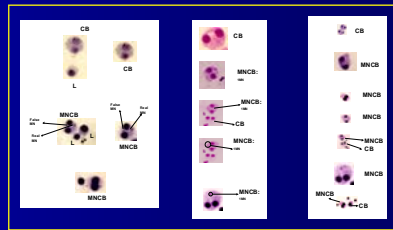


Fig. 4: Estructura del micronúcleo: diferentes tipos de células con bloqueo citogenético (CB: células binucleadas; MN/CB: células binucleadas con micronúcleo; L: linfocito).

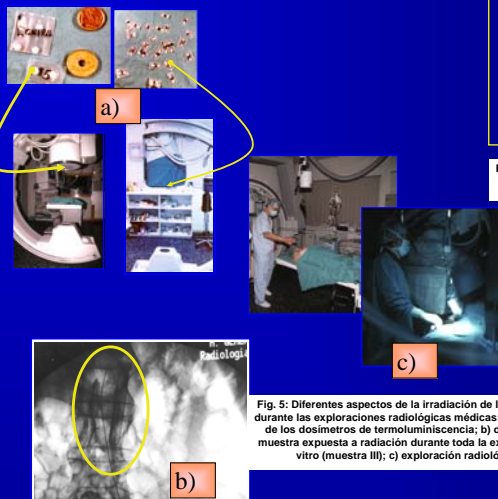


Fig. 5: Diferentes aspectos de la irradiación de los pacientes durante las exploraciones radiológicas médicas: a) ubicación de los dosímetros de termoluminiscencia; b) detalle de la muestra expuesta a radiación durante toda la exploración in vitro (muestra III); c) exploración radiológica.

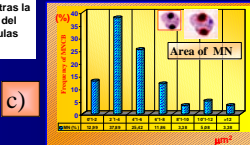
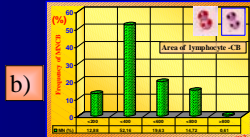
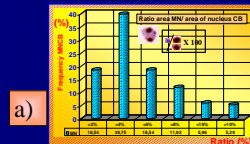


Fig. 6: Área de los micronúcleos en las células binucleadas tras la irradiación gamma: a) relación entre el área del MN/área del núcleo en las células binucleadas (CB); b) área de las células binucleadas (CB); c) área del micronúcleo (MN).

## RESULTADOS.

Se ha obtenido una relación lineal ( $D = \alpha + \beta \cdot y$ ) entre la frecuencia de MN y la dosis de radiación administradas "in vitro". En 12 de los 13 pacientes se ha puesto de manifiesto un aumento de MN tras la administración del I<sup>131</sup> (92.30 %: 12/13), que muestra significación estadística ( $p < 0.01$ ) respecto de las muestras no irradiadas. La frecuencia tras el tratamiento con I<sup>131</sup> casi ha triplicado la frecuencia espontánea (3 MN/500CB; 0'006 MN/CB). La DECT determinada en este estudio es de 95'07 mGy en su comparación con las frecuencias determinadas "in vitro" para radiación gamma.

Orden	Sexo	Edad	Tipo Cáncer	Preirradiación MN/500 CB	Postirradiación MN/500 CB
1	V	56	Melanoma	1	6
2	M	26	Melanoma	5	6
3	M	53	Papilar	3	10
4	M	67	Papilar	4	8
5	M	18	Papilar	3	11
6	M	49	Folicular	4	10
7	M	37	Papilar	3	7
8	M	52	Papilar	5	4
9	M	25	Papilar	5	9
10	M	49	Papilar	4	8
11	M	53	Papilar	4	8
12	M	64	Papilar	5	10
13	M	50	Folicular	5	9

Media = 3'92      8'15

Para radiación X: DECT = 95'07 mGy

Para radiación gamma: DECT = 38'10 mGy

Fig. 8: Número de micronúcleos (MN) en células binucleadas (BC) en los pacientes irradiados por carcinoma de tiroides. Determinación de la dosis equivalente corporal total que supone dicho tratamiento al aplicar las curvas dosis-efecto obtenidas "in vitro" para radiación X y gamma.

## CONCLUSIÓN.

La terapia con I<sup>131</sup> induce un incremento significativo de la frecuencia de MN en los pacientes irradiados por carcinoma de tiroides. La dosis equivalente corporal total es de 95 mGy tras los tres primeros días de la administración terapéutica del I<sup>131</sup>.

Cod.	Edad (años)	Sexo	EXPLORACION	Fase de	Cél. CB contadas	Cél. sin MN	Cél. con MN	Distribución de Micronúcleos/cél (CB)			Σ MN	Dosis (mGy)						
								1 MN	2 MN	3 MN								
1	21	V	Anteografía de miembro inf.	SI	500	497	3	3	3	500	497	3	3	0.58				
2	26	V	Anteografía de miembro inf.	SI	500	497	3	3	3	500	496	4	3	1	0.38			
3	41	V	Cineangiografía.	SI	500	496	4	4	4	500	489	11	10	14	17.32			
4	42	V	Anteografía.	SI	500	496	4	4	4	500	497	3	3	3	4.24			
5	46	V	Cineangiografía.	SI	500	497	3	3	3	500	496	4	4	6.45				
6	48	V	Anteografía.	SI	500	498	2	2	2	500	498	2	2	2	4.77			
7	50	V	Cineangiografía.	SI	500	496	4	4	4	500	495	5	5	5	4.28			
8	50	V	Anteografía aortobacil.	SI	500	497	3	3	3	500	496	4	4	4	1.21			
9	50	V	Cineangiografía.	SI	500	496	4	4	4	500	494	6	5	1	7	9.45		
10	53	V	Anteografía de miembro inf.	SI	500	495	5	5	5	500	496	4	2	1	9	0.53		
11	54	V	Anteografía de miembro inf.	SI	500	496	4	4	4	500	493	7	6	1	8	1.51		
12	54	V	Cineangiografía pericardíaca.	SI	500	491	9	7	2	11	500	493	7	5	2	9	4.19	
13	54	V	Anteografía.	SI	500	498	2	2	2	500	495	5	4	1	6	4.66		
14	60	V	Cineangiografía.	SI	500	497	3	3	3	500	493	7	5	2	9	4.53		
15	60	V	Cineangiografía.	SI	500	484	6	5	1	7	500	490	10	7	1	2	15	3.75
16	62	V	Cineangiografía.	SI	500	489	11	11	1	11	500	491	6	9	9	2	20	2.10
17	64	V	Urografía intravenosa.	SI	500	489	11	10	1	12	500	486	14	14	1	20	0.32	
18	64	V	Urografía intravenosa.	SI	500	493	7	7	7	7	500	492	3	4	2	10	0.25	
19	66	V	Cineangiografía transcat.	SI	500	492	8	6	2	10	500	490	10	10	10	1	1.97	
20	67	V	Cineangiografía.	SI	500	479	21	19	2	23	500	485	15	14	1	16	1.88	
21	68	M	Cineangiografía.	SI	500	488	12	12	12	12	500	484	16	14	2	18	4.07	
22	72	V	Endoprotista.	SI	500	490	10	10	10	10	500	490	10	7	3	13	2.20	
23	77	V	Anteografía.	SI	500	492	8	7	7	1	10	500	490	10	10	10	4.10	
24	82	M	Anteografía renal.	SI	500	493	7	7	7	7	500	495	5	5	5	5	0.71	
25	84	M	Anteografía.	SI	500	487	13	13	13	13	500	495	5	4	1	6	1.072	

Fig. 7: Número de micronúcleos (MN) en células binucleadas (BC) y distribución de BC que presentan uno o más micronúcleos en los pacientes irradiados durante exploraciones de radiodiagnóstico médico (Preirradiación y Post-irradiación).

# MICRONUCLEUS ASSAY IN HUMAN LYMPHOCYTES IRRADIATED DURING MEDICAL RADIODIAGNOSTIC EXPLORATION



<sup>1</sup>Alcaraz, M.; <sup>1</sup>Gómez-Moraga, A.; <sup>1</sup>Rosa, B.; <sup>2</sup>Vicente, V.; <sup>3</sup>Canteras, M.

<sup>1</sup>Radiology and Physical Medicine Department; <sup>2</sup>Pathology Department and <sup>3</sup>Biostatistical Department. Faculty of Medicine. University of Murcia. 30100 Espinardo. Murcia. Spain. Tel: 34 968 363601; Fax: 34 968 364150; E-mail: mab@fcu.um.es.

## INTRODUCTION.

The cytokinesis blocking method in lymphocytes, described by Fenech and Morley (1985) and based on earlier observations by Carter (1967), is now considered to be the best for the micronucleus assay for dosimetry purposes.

In the present work the "in vitro" dose response for X-irradiation, gamma-radiation (Cs-137) and "in vivo" response in patients irradiated during medical radiodiagnostic exploration has been studied.

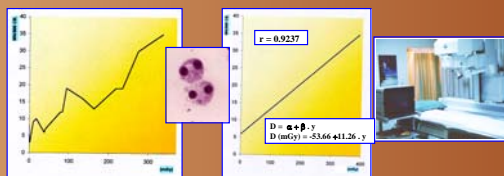


Fig. 1: Dose-effect curves for X-ray induced micronuclei (MN/500 CB) (0-335 mGy).

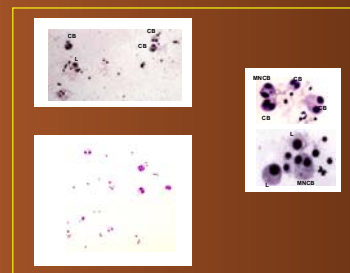


Fig. 3: Photomicrographs of different micronuclei preparations (CB: binucleated cells (cytokinesis-blocked cell); MN/CB: binucleated blocked-cells with micronuclei ; L: lymphocyte).

## MATERIALS AND METHODS.

The appearance of micronuclei (MN) in the lymphocytes of patients irradiated during medical radiodiagnostic explorations was studied to establish the existence of a dose-response relationship between irradiation with low doses of X-rays and the frequency of micronucleus appearance and to determine the importance of the Cytogenetic Block test to reveal these exposures.

Firstly, dose-response curves have been obtained in order to determine MN occurrence in peripheral blood lymphocytes in nine healthy patients in connection with the radiation doses administered. Subsequently, total blood samples of 25 patients having undergone any complex radiological procedure have been analysed. Three different blood samples have been collected from those patients as follows: 1) prior to irradiation, corresponding to a non-irradiated control sample; 2) prior to irradiation, to which the radiological contrast (Hexabrix) was added at a concentration of 5%; 3) sample obtained at the beginning of the examination but remaining "in vitro", exposed to the primary irradiation beam throughout the radiological exploration; 4) sample obtained from the patient at the end of the radiological procedure.

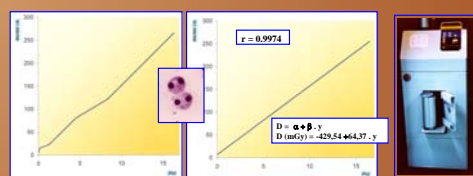


Fig. 2: Dose-effect curves for gamma-irradiation induced micronuclei (MN/500 CB) (0-16'362 Gy).

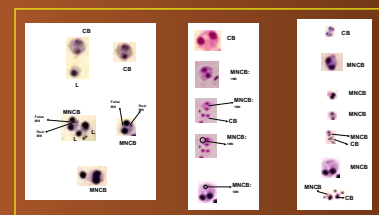


Fig. 4: Structural micronuclei: different cytochalasin blocked cells (CB: binucleated cells (cytokinesis-blocked cell); MN/CB: binucleated blocked-cells with micronuclei ; L: lymphocyte).

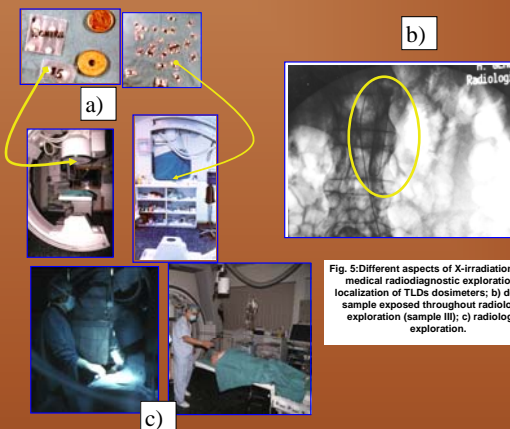


Fig. 5: Different aspects of X-irradiation during medical radiodiagnostic exploration: a) localization of TLDS dosimeters; b) detail of sample exposed throughout radiological exploration (sample III); c) radiological exploration.

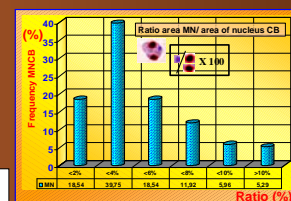
## RESULTS.

The results show a dependency relationship between micronucleus frequency and patient age ( $r = 0.9237$ ;  $p < 0.01$ ). Likewise, a significant increase of MN in patients' samples obtained after radiological examinations (irradiated samples) compared to those obtained before examinations (control samples) ( $p < 0.01$ ) has been observed. The radiological contrast medium has not produced significant changes in MN induction to the concentration used in this study.

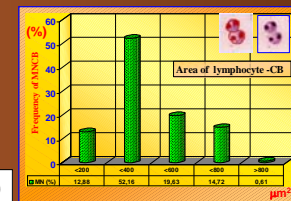
## CONCLUSION.

The irradiation for medical radiological exploration shows a significant increase of MN in the patients studied (samples non-irradiated versus samples irradiated).

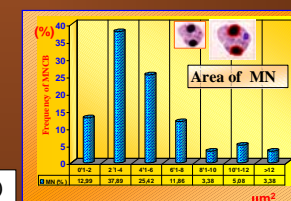
The micronucleus assay is simple and could be applied in situations where physical dosimetry is not possible. It could be used to assess individual sensitivity to radiation and to determine exposures to low doses of irradiation if a previous comparative pattern were available for the exposed worker or patient.



a)



b)



c)

Fig. 6: Area of micronuclei in binucleated cells after "in vitro" gamma-irradiation: a) ratio area MN area nucleated in binucleated cells (CB); b) area of binucleated cells (CB); c) area of MN.

Code	Age (years)	Sex	EXPLORATION	Sediment	PREIRRADIATION				POSTIRRADIATION				Dose (mGy)		
					Cells (CB) scored	Cells without MN	Cells with MN	Micronucleus distribution cell (CB) % MN	Cells (CB) scored	Cells without MN	Cells with MN	Micronucleus distribution cell (CB) % MN			
1	21	+	Anteroposterior of mammars inf.	Yes	500	497	3	3	3	500	497	3	3	0.58	
2	26	+	Anteroposterior of mammars inf.	-	500	497	3	3	3	500	496	4	3	0.58	
3	41	+	Curvilinear anteroposterior.	Yes	500	496	4	4	4	500	489	11	10	14.732	
4	42	+	Anteroposterior	-	500	496	4	4	4	500	497	3	3	4.24	
5	46	+	Curvilinear anteroposterior.	-	500	497	3	3	3	500	496	4	4	6.45	
6	48	+	Anteroposterior	Yes	500	498	2	2	2	500	498	2	2	4.77	
7	50	+	Curvilinear anteroposterior.	Yes	500	496	4	4	4	500	495	5	5	4.28	
8	50	+	Anteroposterior	Yes	500	497	3	3	3	500	496	4	4	1.21	
9	50	+	Curvilinear anteroposterior.	Yes	500	496	4	4	4	500	494	6	5	7.945	
10	53	+	Anteroposterior of mammars inf.	-	500	495	5	5	5	500	496	4	3	9.653	
11	54	+	Anteroposterior of mammars inf.	Yes	500	496	4	4	4	500	493	7	6	8.151	
12	54	+	Microcinematography (oblique)	Yes	500	493	7	7	11	500	493	7	5	9.419	
13	54	+	Curvilinear anteroposterior.	-	500	498	2	2	2	500	495	5	4	6.466	
14	60	+	Curvilinear anteroposterior.	Yes	500	497	3	3	3	500	493	7	5	9.453	
15	60	+	Curvilinear anteroposterior.	-	500	484	6	5	1	7	500	490	10	7	15.373
16	62	+	Curvilinear anteroposterior.	-	500	489	11	11	11	500	491	9	9	9.210	
17	64	+	Anteroposterior of mammars inf.	-	500	495	5	5	5	500	486	14	14	20.632	
18	64	+	Curvilinear anteroposterior.	-	500	493	7	7	7	500	492	8	8	10.125	
19	66	+	Cholangiography manual.	Yes	500	492	8	6	2	10	500	490	10	10	1.97
20	67	+	Curvilinear anteroposterior.	-	500	479	21	19	2	23	500	455	15	14	16.188
21	68	-	Curvilinear anteroposterior.	-	500	488	12	12	12	500	484	16	14	18.407	
22	72	+	Anteroposterior.	-	500	490	10	10	10	500	490	10	7	13.220	
23	77	+	Anteroposterior.	Yes	500	492	8	7	1	10	500	490	10	10	4.410
24	82	-	Basal anteroposterior.	-	500	493	7	7	7	500	495	5	5	0.71	
25	84	-	Anteroposterior.	-	500	487	13	13	13	500	495	5	4	1.972	

Fig. 7: Number of micronuclei (MN) in binucleated cells (BN) and distribution of BN presenting one or more micronuclei in the patients irradiated during medical radiodiagnostic exploration (Pre-irradiation: sample I; Post-irradiation: sample IV).





# EFFECT OF RADIATION ON THYROID PEROXIDASE ACTIVITY IN RABBIT.



University of the West of England  
BRISTOL

<sup>1</sup>Alcaraz, M.; <sup>1</sup>Almagro, A.; <sup>2</sup>Solano, F.; <sup>1</sup>Gómez-Moraga, A.; <sup>1</sup>Genovés, J.L.; <sup>3</sup>Canteras, M.

<sup>1</sup>Radiology and Physical Medicine Department; <sup>2</sup>Biochemistry and Molecular Biology Department, and <sup>3</sup>Biostatistical Department. Faculty of Medicine. University of Murcia. 30100-Espinardo. Murcia. Spain. Tel: 34 968 363601; E-mail: mab@fcu.um.es.

## INTRODUCTION.

Some studies show that the thyroid function decreases following external radiation of the thyroid gland with doses as used on human patients (Holten, 1983) and with a similar fractioning of doses in experimental studies (Alcaraz et al., 1988). It has been suggested that this functional decrease is due to immediate cellular death and lesion of the enzyme systems of the radiation-induced surviving cells (Holten, 1983). However, there are very few studies on the effect of radiation on the enzyme systems of the follicular cells.

Studies with 125-I confirm this different sensitivity of the enzyme systems and suggest that irradiation would cause changes in the enzymatic systems of the follicular cells (Gross et al., 1968; Vickery and Williams, 1971).

The guaiacol assay is the technique used by numerous authors to determine the TPO activity in normal thyroid glands and after administering to animals of different substances "in vivo" and "in vitro" (Solano et al., 1991; Engler et al., 1983; Shirozu et al., 1983; Magnusson and Rapoport, 1985; Taugog and Dorris, 1989). The TPO activity of the thyroid glands of normofunctioning rabbits is greater to that previously described in other non-rodent mammals, such as beef (Solano et al., 1981).

## MATERIALS AND METHODS.

Sixty specimens of 3-month-old New Zealand rabbits (Biocenter, Spain), weighing approximately 2,700 g at the beginning of the study and kept at 18-22 °C, an ambient humidity between 50-70% and in a 12-h day-night cycle, were fed with commercial fodder (U.A.R. 112 Panlab, Spain) and allowed water "ad libitum".

The animals were divided into four groups: - Group I: Nine animals which had received no type of treatment prior to irradiation (normofunctioning group). - Group II: Nine animals whose thyroid functional activity was reduced by administration of propyl-thiouracil (PTU) (Sigma, USA) over the 4 weeks prior irradiation. The PTU was administered to the drinking water at a concentration of 0.2% and supplemented with 1% sucrose. - Group III: Nine animals whose thyroid functional activity was stimulated by administration of protirelin (TRH) (Lab. Frumstos-Prem, Spain) during the week prior to irradiation. The TRH was administered intravenously, at a dose of 200 µg/8hours, through a polyethylene catheter inserted into the right external jugular vein. - Group IV: Group of 33 animals, denominated the "variable post-irradiation period group", was used to plot a response curve of thyroid peroxidase activity (TPO) at 0, 24 and 48 hours after irradiation.

The irradiation field was 5 cm in diameter upon the thyroid cartilage. The X-rays were delivered by a therapy unit (Securix 2612 Compact, CGR) with 120 kV, 12 mA, 1 mm Cu of HVL, filtration of 1 mm Cu and 0.5 mm Al, FSD 50 cm and absorbed dose rate of 1.15 Gy/min. In the first three groups, the total X-ray dose administered was 0 (as control), 10 and 20 Gy, fractionated at 2 Gy/day, on alternative days. In the fourth group, the doses administered were 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 Gy, in a single session. All the animals were immobilised and conscious during irradiation. ASSAY FOR PEROXIDASE ACTIVITY: The peroxidase activity of the thyroid preparations was tested using the guaiacol method as described by Chance and Maehly (1967) slightly modified by Solano et al., (1981). Briefly, the method consists of measuring the absorbance increase per minute, at 470 nm using a spectrophotometer and cuvettes of 1 ml total volume. The reaction mixture contained 0.9 ml of 20 mM guaiacol in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.2, 50 µl 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 50 µl of rabbit thyroid extracts. The activity units was defined as the amount of enzyme that produced an increase of an absorbance unit per minute under the assay conditions. PROTEIN DETERMINATION: The protein content of the enzymatic extracts was determined by a modified Lowry method (Hartree, 1972) using BSA as standard. Differences in the values of peroxidase activity were tested by analysis of variance.

## RESULTS.

**Non-irradiated animals:** the values for TPO activity in the non-irradiated animals are shown in Figure 1. The increase in TPO activity in TRH-treated animals was 48 % compared to the non-irradiated normofunctioning animals. The drop in activity in the PTU-treated animals was 72% compared to the values presented by the normofunctioning animals. However, the present data only demonstrate significance in the fall in the TPO activity of the PTU-treated animals when compared to the other two groups; the values of the latter two groups are similar. This relation may be expressed as follows:  $N = TRH > PTU$  ( $p < 0.01$ ).

**Normofunctioning variable post-irradiation period group:** the values for TPO activity in the variable post-irradiation period group are shown in Figure 3. The irradiated animals presented a decrease in TPO activity, even with the lowest radiation doses (2 Gy), in the three study periods (0, 24 and 48 hours). Analysis of the statistical significance reveals that TPO activity in the irradiated animals with a post-irradiation period of 24 hours is greater than TPO activity in the irradiated animals with a post-irradiation period of 0 and 48 hours; the activities of the latter two groups (0 and 48 hours) are similar. This relation may be expressed as follows:  $N > N_{24} > N_{0} = N_{48}$  ( $p < 0.001$ ).

**Groups irradiated with a fractionated dose and experimental modification of the thyroid function:** the values for TPO activity in these animals are shown in Figure 2. The normofunctioning animals irradiated with 10 and 20 Gy (2 Gy/alternative days) show a sharp decrease in TPO activity compared to that presented by the non-irradiated normofunctioning animals. This relation shows statistical significance and can be expressed as follows:  $N > N_{10} = N_{20}$  ( $p < 0.05$ ).

The PTU-treated animals irradiated with 10 and 20 Gy show no significant differences in TPO activity from that of the non-irradiated PTU-treated animals:  $PTU_{10} = PTU_{20} = PTU_{0}$ . The irradiated TRH-treated animals present a drastic fall in the TPO activity of their thyroid glands compared with the values of the non-irradiated TRH-treated animals:  $TRH_{10} > TRH_{20} = TRH_{0}$  ( $p < 0.001$ ). In the three animal groups (normofunctioning, PTU-treated and TRH-treated) and irradiated with 20 Gy shows a greater decrease in TPO activity than 10 Gy; however, these differences are not statistically significant.

## CONCLUSION.

This work shows that the peroxidase activity of the follicular cells decrease following external radiation of the thyroid gland with a fractioning of doses similar to that used in human oncology.



Fig. 4: Detail of the irradiation.



Fig. 5: Detail of the rabbit thyroid gland.

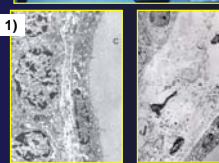


Fig. 6: Effects of radiation on rabbit thyroid gland ultrastructure. 1) follicles of the thyroid gland lined by cuboidal or squamous epithelia (N, 20 Gy) x 7.500 (C: colloid). 2) Interstitial connective tissue between two follicles (N, 20 Gy) x5000

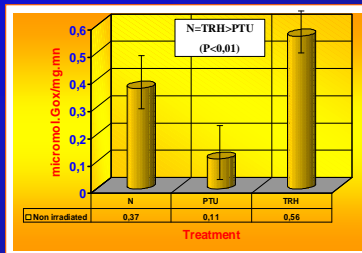


Fig. 1: Non-irradiated animals: Thyroid peroxidase activity (each point represents the determination of three animals).

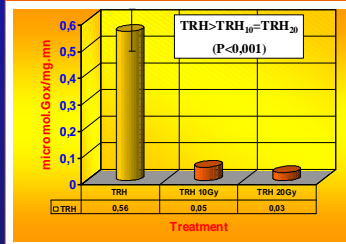
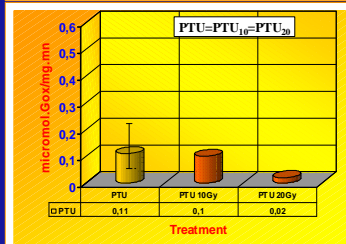
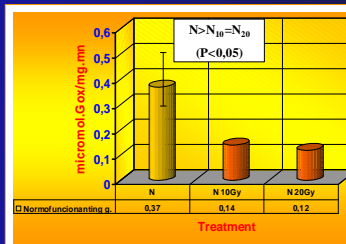


Fig. 2: Thyroid peroxidase activity in three animal groups: normofunctioning, PTU-treated and TRH-treated (each point represents the determination of three animals).

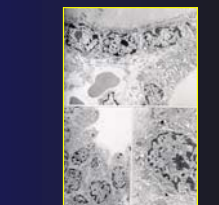


Fig. 7: Detail of a follicle consisting of two layers of follicular cells (PTU, 20 Gy) x5,000



Fig. 8: 1) Detail of the glandular interstitium showing abundant ground substance collagen bundles and loculi of low-electrodense material (TRH, 10 Gy) x 4,000. 2) Note the cytoplasmic vacuolisation of the follicular cells (TRH, 10Gy) X 5,000.

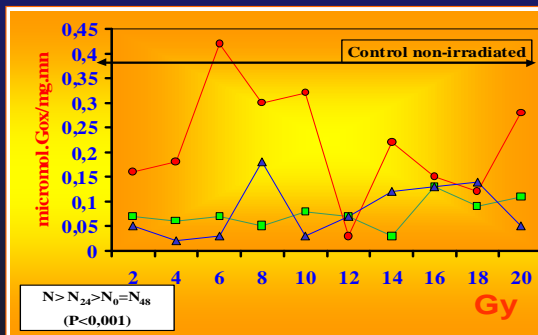


Fig. 3: Normofunctioning animals of the variable post-irradiation period: 0, 24 and 48 hours (each point represents the determination of one animal).

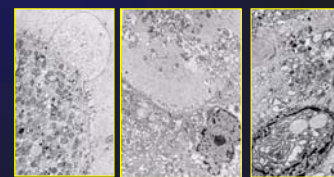


Fig. 9: Sparse short microvilli in the apical zone of a follicular cell. Cells debris of sloughed follicular cell can be seen into the follicular cavity (N, 20 Gy) x 6,300.



# DIFERENCIAS EN LA CONCENTRACION SÉRICA DE BILIRRUBINA TOTAL EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO RESPECTO DE PACIENTES SIN ENFERMEDADES CORONARIAS.



**ACEVEDO C, PAGAN I, BENNANI A, TORNEL PL, AYUSO E, PASCUAL D\* y MARTINEZ P.**

Servicio de Análisis Clínicos y Servicio de Cardiología\*. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia.

## INTRODUCCIÓN

Los lípidos y las lipoproteínas son importantes factores de riesgo para la enfermedad coronaria, sin embargo, no explican el 30% - 40% de casos de IAM. Con el estudio de diferentes parámetros no lipídicos como factores de riesgo cardiovascular, se descubrió que la concentración de bilirrubina total sérica estaba disminuida en pacientes con IAM. (3) La bilirrubina se comporta como un antioxidante y puede prevenir la oxidación de LDL-c (1) reduciendo la acumulación de colesterol en la placa aterosclerótica. (2) Nosotros hemos estudiado la concentración de bilirrubina total sérica así como el perfil lipídico y determinados reactantes de fase aguda, como son la albúmina y el número de leucocitos como posibles factores de riesgo asociados a IAM.

## RESULTADOS

El grupo de IAM (n=101) estaba formado por 28 mujeres y 73 hombres con una media de edad de 67,48 ± 11,97 años. El grupo control (n=107) estaba formado por 32 mujeres y 75 hombres con una media de edad de 68,12 ± 9,3 años. Los valores de ambos grupos aparecen en la Tabla I.

## DISCUSIÓN

La concentración de la bilirrubina sérica fue más baja en IAM que los controles con una p<0,001. Estas observaciones confirman similares resultados (4) con el Framingham offspring study cohort. Schwermer (3) ya descubrió una asociación entre los niveles de bilirrubina sérica y enfermedad coronaria, aunque él estudió un grupo de 619 hombres. El descenso en la concentración sérica de bilirrubina puede ser atribuida a un agotamiento de otros sistemas antioxidantes que potencian la producción de radicales libres. En nuestro estudio, observamos diferencias estadísticamente significativas en bilirrubina total, perfil lipídico, albúmina y número de leucocitos. La implicación del estrés oxidativo e inflamación en el riesgo cardiovascular está bien establecida. En este estudio, los reactantes de fase aguda más utilizados no obtienen los valores que otros estudios (5).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se excluyeron del estudio pacientes con enfermedad hepática (GOT y/o GPT elevadas). Las muestras sanguíneas se obtuvieron por la mañana tras un periodo de 12 horas de ayuno. Las determinaciones bioquímicas que se realizaron fueron: bilirrubina total, albúmina, colesterol, glucosa, GOT/GPT, HDL-c, LDL-c, triglicéridos y número de leucocitos. Las determinaciones se realizaron en un Modular D 2400-P 800 (Roche diagnostics-Manheim, Alemania). Con los reactivos de la casa comercial Roche diagnostics. LDL-c se calculó por la fórmula de Friedewald.

	IAM (media±DS)	CONTROL (media±DS)	
BILIRRUBINA (mg/dl)	0,60 ± 0,27	0,79 ± 0,43	<0,001
GLUCOSA (mg/dl)	115,74 ± 45,47	115,41 ± 45,11	-
COLESTEROL (mg/dl)	178,06 ± 52,95	206,89 ± 39,84	<0,001
TRIGLICERIDOS (mg/dl)	137,33 ± 113,03	125,46 ± 53,28	-
HDL-c (g/dl)	37,67 ± 11,96	55,30 ± 13,83	<0,001
LDL-c (g/dl)	109,09 ± 34,16	138,52 ± 43,68	<0,001
GOT (U/L)	22,73 ± 6,84	21,91 ± 9,1	-
GPT (U/L)	21,44 ± 7,85	20,57 ± 7,63	-
LEUCOCITOS (10 <sup>9</sup> /μl)	8,24 ± 2,66	7,13 ± 1,77	<0,001
ALBÚMINA (g/dl)	3,7 ± 0,54	4,30 ± 0,29	<0,001

## CONCLUSIÓN

La bilirrubina total fue más baja en el grupo de IAM que en el grupo control

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- STOCKER R., YAMAMOTO Y., MC DONAGH AF., GLAZER AN, AMES BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. Science. 1987; 235:1043-6.
- 2.- ESTERBAUER H, GEBICKI J, PUHL H, JURGENS G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radical Biol. Med. 1992; 13:341-90.
- 3.- SCHWERTNER HA, JACKSON WG, TOLAN G. Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of artery disease. Clin. Chem. 1994; 40:18-23.
- 4.- DJOUSSE L, LEVY D, CUPPLES LA, EVANS JC, D'AGOSTINO RB, ELLISON RC. Total serum bilirubin and risk of cardiovascular disease in the Framingham offspring study. Am y Cardiol. 2001; 87: 1196-1200.
- 5.- DANESU J, COLLIN R, APPLEBY P AND PERO R. Association of fibrinogen, c-reactive protein, albumin or leukocyte count with coronary heart disease. Jama. 1998; 279: 1477-1.482.





# NT-PROBNP COMO FACTOR DIAGNÓSTICO DE IC EN PACIENTES CON DISNEA DE ETIOLOGÍA INCIERTA.



CASAS T, PAGÁN I, ACEVEDO C, MARTINEZ A, SARABIA A Y MARTINEZ P.

Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia.

## INTRODUCCIÓN

La detección de un aumento en los niveles de peptido natriurético cerebral (BNP) puede ayudar al diagnóstico de insuficiencia cardiaca. La detección analítica de la fracción N-terminal pro-BNP puede aportar ventajas teóricas sobre la del BNP, sin embargo su papel diagnóstico y su valor en una población con disnea agudizada de origen incierto no ha sido definida.

## OBJETIVOS

Investigar la repercusión clínica del uso diagnóstico del NT-proBNP en el manejo urgente de pacientes con disnea de origen incierto.

## RESULTADOS

Se incluyeron 52 pacientes (70±11 años, 54% mujeres) con disnea de origen incierto tras consulta en el Servicio de Urgencias (tabla 1). Tras la valoración inicial en urgencias, 48 pacientes (92%) fueron clasificados en el grupo A (IC) y sólo 4 (8%) en el grupo B (No IC). Atendiendo al diagnóstico final, en los 4 pacientes del grupo B el diagnóstico final fue "no IC", concordante con el inicial. Sin embargo, en 12 (25%) de los 48 pacientes del grupo A el diagnóstico final fue "no IC", discordante con el inicial (Tabla 2). Atendiendo al valor de NT-proBNP, este mostró su mejor valor de corte en 900 pg/ml, para el cual obtuvo respecto al diagnóstico final un valor predictivo negativo del 100% y positivo del 86% (Tabla 3 y Figura 1). La correlación respecto al diagnóstico final fue mejor para el NT-proBNP (r=0.73, p<0,001 vs) que para el diagnóstico inicial (r=0.43, p=0.001). El uso del NT-proBNP añadido a la valoración clínica en el diagnóstico inicial hubiera permitido clasificar correctamente como "no IC" a 7 (58%) de los 12 falsos diagnósticos iniciales de IC en el grupo A; mientras que 1 de los 4 pacientes sin IC del grupo B hubiera sido clasificado incorrectamente como "IC" (Tabla 4).

TABLA 2. Correlación diagnóstico clínico inicial y final

Diagnostico inicial IC	IC FINAL		
	SI	NO	
Si IC	36	12	48
No IC	0	4	4
	36	16	52

R=0.73, p<0.001

S=100%  
E=63%  
VPN=100%  
VPP=86%  
Precisión 89%

TABLA 3. Correlación NT-proBNP > 900 y diagnóstico final

NT-proBNP	IC FINAL		
	SI	NO	
> 900	36	6	42
< 900	0	10	10
	36	16	52

R=0.43, p=0.001

S=100%  
E=25%  
VPN=100%  
VPP=75%  
Precisión 77%

Verdaderos diagnósticos  
Falsos diagnósticos

## MATERIAL Y MÉTODOS

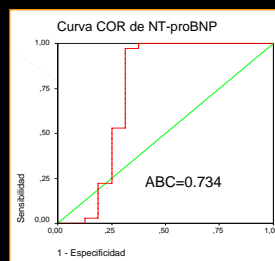
Estudio prospectivo desde junio 2002 hasta enero del 2003, que incluyó pacientes que consultaron en el servicio de urgencias por disnea y en los que el médico responsable de su atención inicial, tras anamnesis, exploración física, Rx tórax y electrocardiograma, estableció la concurrencia de al menos dos posibles etiologías, siendo una de ellas la insuficiencia cardiaca (IC). De acuerdo con su decisión clínica de manejo clasificó a cada paciente con el diagnóstico inicial de IC (grupo A) o no IC (grupo B). En todos los pacientes, a su llegada a urgencias se extrajo una muestra para la determinación de NT-proBNP (Elecsys 1010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) con carácter ciego. El diagnóstico final de IC se estableció por consenso de dos cardiólogos después de revisar a posteriori la historia clínica de cada paciente, de forma ciega para el resultado del NT-proBNP.

TABLA 4. Valor del NT-proBNP añadido al diagnóstico inicial

Diagnostico inicial IC	IC FINAL		
	SI	NO	
Si IC	36	12	48
BNP<900	0	7	
BNP>900	36	5	
No IC	0	4	4
BNP<900	0	3	
BNP>900	0	1	

TABLA 1. Características basales

Edad	70±11
> 60 años	86%
>70 años	64%
>80 años	32%
Sexo femenino	54%
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	31±7
Obesidad (IMC ≥ 27)	69%
Factores de riesgo CV	
Hipertensión arterial	65%
Fumador activo	11%
Hipercolesterolemia	29%
DM	33%
Cardiopatía previa	
IC previa	54%
Cardiopatía isquémica	27%
IAM previa	21%
Fibrilación auricular previa	39%
FEVI	
<50% conocida	21%
>50% conocida	32%
Desconocida	47%
Valvulopatía mod/sev	17%
Marcapasos	11%
Duréticos de asa	62%
Broncopatía conocida	47%
Esteroides	11%
Broncodilatadores	18%
Insuficiencia renal crónica	14%
Diagnóstico diferencial	
Broncopatía	58%
TEP	16%
Otros (obesidad, psicógeno)	26%



## CONCLUSIÓN

- La presencia de IC tiende a sobrediagnosticarse en pacientes con disnea de origen incierto que consultan en el área de urgencias
- Un valor de NT-proBNP por debajo de 900 pg/ml permite reducir el número de falsos diagnósticos en pacientes con disnea de origen incierto y sospecha clínica de IC.
- Su uso indiscriminado en pacientes con disnea podría conllevar errores por sobrediagnóstico.



# EFECTO GENOTÓXICO EN MÉDULA ÓSEA DE RATÓN INDUCIDO POR UN CAMPO ELECTROMAGNÉTICO



<sup>1</sup> M Alcaraz, <sup>1</sup>MJ Dato, <sup>1</sup>C Acevedo, <sup>2</sup>J Margineda, <sup>2</sup>P Campos y <sup>3</sup>M Canteras.

<sup>1</sup> Departamento de Radiología; <sup>2</sup> Departamento de Física; <sup>3</sup> Departamento de Bioestadística. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. 30100 Espinardo- MURCIA. (mab@um.es).

## INTRODUCCIÓN

El test de micronúcleos "in vivo" es un método descrito originariamente para la detección de alteraciones cromosómicas provocadas por sustancias químicas. Las sustancias se administran a pequeños roedores, y su efecto se analiza directamente sobre preparaciones microscópicas de su médula ósea. El ensayo de micronúcleos sobre eritrocitos policromatófilos de médula ósea (PCEs), desarrollado por Schmidt (1975), es probablemente el test más utilizado en el estudio genotóxico a corto plazo realizado "in vivo". El análisis de micronúcleos sobre PCEs es un método simple para la detección del daño cromosómico producido por agentes químicos y físicos (Heddle and Salamone, 1981; Almassy et al., 1987; Mavournin et al., 1990; Krishna et al., 1992; Mazur, 1995). El ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón es probablemente el test más significativo en términos de riesgo humano (Ashby et al., 1997).

## OBJETIVO

Determinar un posible efecto genotóxico de la radiación electromagnética mediante el test de micronúcleos "in vivo" de médula ósea de ratón.

## MATERIAL Y METODO.

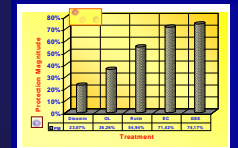
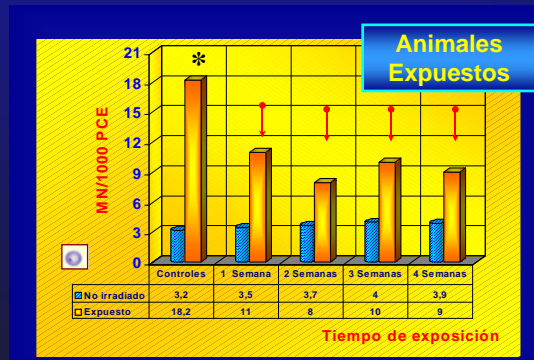
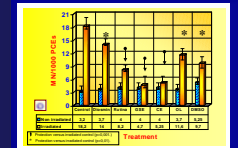
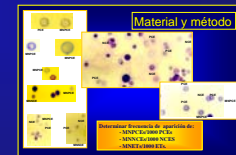
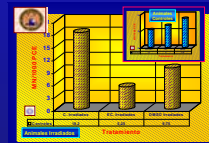
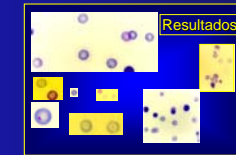
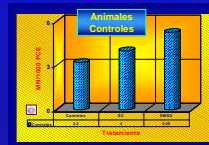
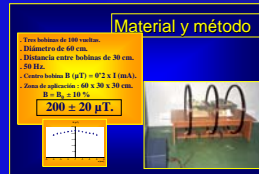
Para ello, se han realizado tres tipos de experiencias diferentes: a) exposición a radiación electromagnética (200µT, 50Hz) en exposición corporal total durante diferentes periodos (0, 7, 14, 21 y 28 días); b) exposición a rayos X en exposición corporal total con dosis de 48 cGy en exposición única; c) la administración de sustancias polifenólicas (GSE) durante 4-5 días previos a los diferentes tipos de exposiciones

## RESULTADOS.

Los resultados muestran incremento del número de micronúcleos en 1000 eritrocitos policromatófilos de médula ósea (MNPCEs) tras la exposición a rayos X (p<0,001) y en donde la administración de los GSE disminuye la frecuencia de MNPCEs esperados (p<0,001). La frecuencia de MNPCEs en todos los lotes expuestos a radiación electromagnética es superior a la frecuencia en los lotes controles no expuestos, llegando a ser el doble de la frecuencia espontánea de MNPCEs y en la que se aprecia significación estadística (p<0,01); en estos animales no se observa ninguna modificación tras la administración de GSE.

## CONCLUSIÓN.

Por tanto, la radiación electromagnética de 200µT ensayada induce un incremento significativo de la frecuencia de MNPCEs que pone de manifiesto un efecto genotóxico inducido por la exposición electromagnética.



# PROTECTIVE EFFECTS AGAINST CHROMOSOMAL DAMAGE INDUCED IN VIVO BY X-RAYS OF SEVERAL PLANT POLYPHENOLIC EXTRACTS.

<sup>1</sup>Alcaraz, M.; <sup>4</sup>Benavente-García, O.; <sup>4</sup>Castillo, J.; <sup>1</sup>Redondo, A.; <sup>4</sup>Lorente, J.; <sup>2</sup>Vicente, V.; <sup>3</sup>Canteras, M.

<sup>1</sup>Radiology and Physical Medicine Department; <sup>2</sup>Pathology Department; <sup>3</sup>Biostatistical Department; Faculty of Medicine. University of Murcia. 30100 Espinardo. Murcia. Spain. Tel: 34 968 363601; Fax: 34 968 364150; E-mail: mab@fcu.um.es.  
<sup>4</sup>Research and Development Department of Furfural Español S.A. 80320 Murcia. Spain.

## INTRODUCTION.

The micronucleus test *in vivo* is a method devised primarily for screening chemicals for chromosome-breaking effects. The test substances are normally applied sub-acutely to small mammals, and the effect is read in direct smears from bone marrow. The micronucleus assay on mouse bone marrow polychromatic erythrocytes, originally developed by Schmidt (1975), is probably the most frequently used *in vivo* short-term genotoxicity tests. Bone marrow micronucleated erythrocytes provide a simple and rapid method for detection of chromosomal damage by chemical and physical agents (Heddle and Salamone, 1981; Almasy et al.; 1987; Mavournin et al., 1990; Krishna et al., 1992; Mazur, 1995). The mouse bone marrow MN assay results are probably the most significant in terms of potential human hazard (Ashby et al., 1997). An increase in the frequency of micronucleated PCEs is, therefore, an indication of aneuploidy or clastogenic induction. For this reason, micronuclei have been widely used to detect chromosomal breakage and chromosome lagging "in vivo" and "in vitro" (Watanabe et al., 1997; Kiersch-Volders, 1997).

## MATERIALS AND METHODS.

**Animals:** Male Swiss mice (9-12 weeks old) weighing 29-32 g were used for the experiments. All animals received a standard diet (Rodent toxicology diet<sup>®</sup>, BYK Universal, France) and tap water "ad libitum". For each experimental point 6 mice were used.

**Chemicals and Treatment:** The polyphenolic extracts were administered orally. All solutions were freshly prepared directly before treatment of the animals: Grape Seeds Extract (GSE), Citrus Fruit Extract (CE), Olive Leaf Extract (OL) and 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) were dissolved in 0.2% drinking water and administered during 5 days before the X-irradiation. DMSO was dissolved in water (50 g/100 ml). Diosmin and rutin were dissolved in DMSO (300 mg/ml). DMSO, diosmin and rutin were injected by oesophageal tube at a single dose of 0.6 ml directly into the lumen gastric 6h before the X-irradiation.

**Exposure to X-rays:** The mice were whole-body X-irradiated using CGR apparatus with radiocopy (General Electric, Spain) with 120 kV, 1.4 mA, filter 2.5 mm Al, exposure rate of 2 cGy/min, FOD 100 cm. The mice were exposed to a single dose of 48 cGy. The X-rays exposure was established by means of thermoluminescent dosimeters (TLDs) (GR-200<sup>®</sup>, Conceptor Electronics Technology Co.Ltd, China). The TLDs were supplied and measured by CIEMAT (Ministry of Industry and Energy, Spain)

**Micronucleus Test:** The micronucleus test on the bone marrow cells was performed according to Schmidt (1975). Two femurs were removed from each mouse 24 h after X irradiation and the bone marrow cells were gently flushed out with fetal calf serum, they were dispersed, collected by centrifugation and re-suspended. The slides were stained with May-Grünwald / Giemsa. The number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MnPCEs) among 2000 PCEs per mouse were determined. The ratio of PCEs/ Erythrocytes (polychromatic + normochromic erythrocytes) was also determined to assess the cytotoxic effect of substances. Differences in the incidence per animal of MnPCEs/1000 PCEs and PCEs per 1000 erythrocytes (PCEs + NCEs) were tested by analysis of variance.

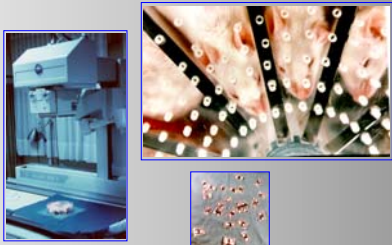


Fig. 3: Detail of X-irradiation. The mice were exposed to a single dose of 48 cGy.



Fig. 4: DMSO, diosmin and rutin were injected directly into the lumen gastric before the X-irradiation.



Fig. 5: Two femurs were removed from each mouse 24 h after X-irradiation and the bone marrow cells were collected by centrifugation and re-suspended.

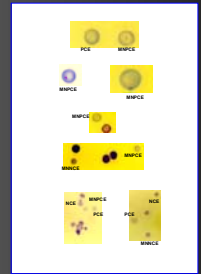


Fig. 6: The slides were stained with May-Grünwald/Giemsa. The number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MnPCEs) among 2000 polychromatic erythrocytes (PCEs) per mouse were determined.

## RESULTS.

The data presented show that whole-body exposure to 48 cGy of X-rays results in a substantial increase in the frequency of MnPCEs in comparison with that occurring spontaneously ( $p < 0.001$ ). There is a significant reduction of frequency of MnPCEs in all pre-treated irradiated groups compared with the control and irradiated group.

Figure 1 shows the influence of treatments on the frequencies of MnPCEs in bone marrow of animals non-irradiated and irradiated, thus permitting a comparison of the potential toxicity of each treatment versus their anticlastogenic activity. Diosmin, rutin, GSE, CE and OL show very low levels of MnPCEs generation, similar with respect to non-irradiated control data. Also, Figure 1 shows the influence of X-rays irradiation on the frequencies of MnPCEs in mouse bone marrow. There is a significant reduction of frequency of MnPCEs in the pre-treated groups compared with the irradiated control group. The order of treatments with respect to the minor level of MnPCEs generated after irradiation is: GSE < CE < rutin < DMSO < OL = PTU = Vit C < diosmin. The radioprotective effects and consequently the anticlastogenic activity of the different treatments used, was established according to the increase of MnPCEs level in animals after irradiation and their relation with this level in the control animals, obtaining a percentage value that determines the level of protection of each treatment. Figure 2 shows the values of these protection capacities, the GSE-pre-treated group being the most effective protection against "in vivo" chromosomal damage and cytotoxicity induced by X-rays. The order of effectivity was: GSE > CE > rutin > DMSO > OL = PTU = Vit C > diosmin.

## CONCLUSION.

The studied substances show significant protection against genetic damage caused by radiation, possibly due to their higher capacity for eliminating free radicals induced by radiation, precisely at doses free of toxic side effects, which means a significant difference to the rest of known radioprotective substances.

### GSE < CE < rutin < DMSO < OL = PTU = Vit.C < diosmin

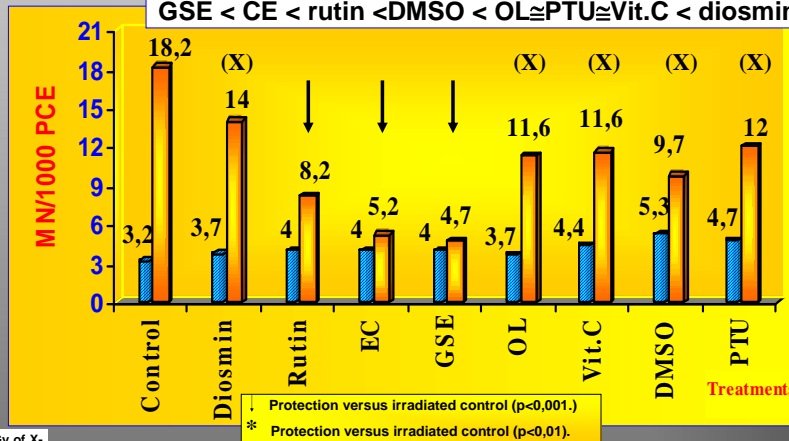


Fig. 1: Influence of treatments and X-rays irradiation on the frequencies of MnPCEs in mouse bone marrow (irradiated (yellow) and non-irradiated (blue)).

### GSE > CE > rutin > DMSO > OL = PTU = Vit.C > diosmin

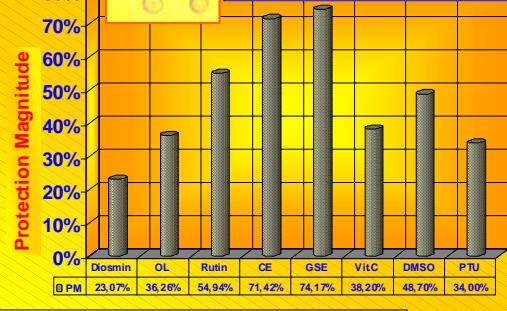


Fig. 2: Level of protection of different treatments in relation to irradiation with X-rays.

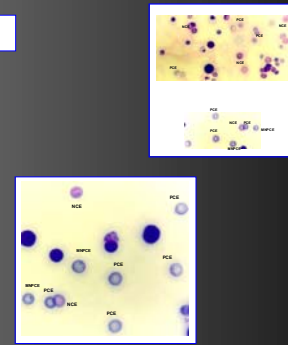
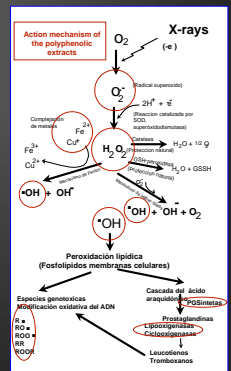


Fig. 7: The ratio of PCEs/Erythrocytes (polychromatic -PCEs- + normochromic erythrocytes -NCEs-) was also determined to assess the cytotoxic effect of substances.





# RADIOPROTECTIVE EFFECTS AGAINST CHROMOSOMAL DAMAGE INDUCED IN HUMAN LYMPHOCYTES BY $\gamma$ -RAYS AS A FUNCTION OF THE POLYMERIZATION DEGREE OF GRAPE SEED EXTRACTS.



1YÁÑEZ, J.; 1MARTINEZ,C.; 2MARTÍN-GIL,R.; 2ALCARAZ, M.; 3CANTERAS, M.; 1VICENTE,V.

1Pathology, 2Radiology and 3Biostatistical Departments. Faculty of Medicine. University of Murcia. 30100 Espinardo. Murcia. Spain (mab@um.es).

## INTRODUCTION

The cytokinesis blocking method in lymphocytes, described by Fenech and Morley (1985) and based on earlier observations by Carter (1967), is now considered to be the best for the micronucleus assay for dosimetry purposes. In the present work the "in vitro" dose response for X-irradiation, gamma-radiation (Cs-137) and "in vivo" response in patients irradiated during medical radiodiagnostic exploration has been studied.

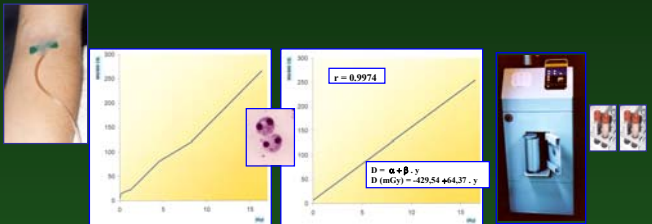


Fig. 4: Dose-effect curves for gamma-irradiation induced micronuclei (MN/500 CB) (0-16'362 Gy).

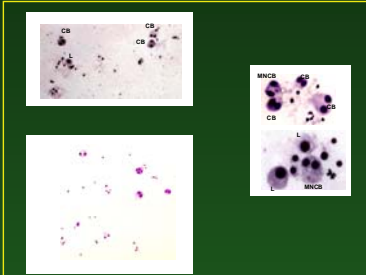


Fig. 5: Photomicrographs of different micronuclei preparations (CB: binucleated cells (cytokinesis-blocked cell); MNCS: binucleated blocked-cells with micronuclei ; L: lymphocyte).

## MATERIALS AND METHODS

**Blood samples and irradiation procedure:** Heparinized samples of human peripheral blood obtained from two healthy, young, non-smoking female donors were used. These blood samples were exposed to <sup>137</sup>Cs gamma-rays with an Irradiator IBL 437 C (CIS, France) at a dose of 2 Gy  $\pm$  3%. The irradiation was performed at room temperature for 40 seconds with a dose rate of 5 cGy/second in the moment of the study. The gamma-ray exposure was established by means of thermoluminescent dosimeters (TLDs) (GR-200, Conqueror Electronics Technology Co. Ltd, China). The TLDs were supplied and measured by CIEMAT (Ministry of Industry and Energy, Spain). The GSEs used in this study were dissolved in 5% aqueous DMSO at 12.5 mg/ml; 25  $\mu$ l of this solution was added to 2 ml of human blood and homogenized before gamma irradiation.

**Culture technique:** The micronucleus assay was carried out on human lymphocyte cultures according an adaptation of the method of Fenech and Morley. Whole blood (1 ml) was cultured at 37°C for 72 hours in 9 ml of F-10 medium, 15% fetal bovine serum, 1.6% phytohaemagglutinin, and 1% penicillin/streptomycin (all from Sigma). At 44 hours after initiation of the lymphocyte culture, cytochalasin B (Cyt. B, Sigma) was added in a concentration of 3  $\mu$ g/ml. At 72 hours the lymphocytes were treated with hypotonic solution (KCl,0.075M) for 3 minutes and fixed by methanol-acetic acid (3:1). Air dried preparations were made, and slides were stained with May-Grunwald Giemsa.

**Scoring of micronuclei:** The number of micronuclei in at least 500 cytokinesis-blocked cells was obtained with the use of a Zeiss light microscope (Oberkochen, Germany) with 400X magnification for surveying the slides and 1,000X magnification used to confirm the presence or absence of micronuclei in the cells.

**Statistical analysis:** Differences in frequency among samples were tested by analysis of variance and evaluated by Student's t test. The magnitude of protection (%) was equal to the difference between the frequency of micronuclei in untreated irradiated blood lymphocytes ( $F_{control}$ ) and that in lymphocytes treated with GSE1, GSE2, GSE3, or DMSO before the gamma-ray irradiation ( $F_{treated}$ ), expressed as a percentage of  $F_{control}$ : % Protection ( $F_{control} - F_{treated}$ ) /  $F_{control}$   $\times$  100.

Time (min)	Area (a.u.)	Height (a.u.)
1.0	1.2	1.5
2.0	1.5	1.8
3.0	1.8	2.2
4.0	2.2	2.8
5.0	2.8	3.5
6.0	3.5	4.5
7.0	4.5	5.8
8.0	5.8	7.5
9.0	7.5	9.5
10.0	9.5	12.0
11.0	12.0	15.0
12.0	15.0	18.0
13.0	18.0	22.0
14.0	22.0	28.0
15.0	28.0	35.0
16.0	35.0	45.0
17.0	45.0	58.0
18.0	58.0	75.0
19.0	75.0	95.0
20.0	95.0	120.0
21.0	120.0	150.0
22.0	150.0	180.0
23.0	180.0	220.0
24.0	220.0	280.0
25.0	280.0	350.0
26.0	350.0	450.0
27.0	450.0	580.0
28.0	580.0	750.0
29.0	750.0	950.0
30.0	950.0	1200.0
31.0	1200.0	1500.0
32.0	1500.0	1800.0
33.0	1800.0	2200.0
34.0	2200.0	2800.0
35.0	2800.0	3500.0
36.0	3500.0	4500.0
37.0	4500.0	5800.0
38.0	5800.0	7500.0
39.0	7500.0	9500.0
40.0	9500.0	12000.0
41.0	12000.0	15000.0
42.0	15000.0	18000.0
43.0	18000.0	22000.0
44.0	22000.0	28000.0
45.0	28000.0	35000.0
46.0	35000.0	45000.0
47.0	45000.0	58000.0
48.0	58000.0	75000.0
49.0	75000.0	95000.0
50.0	95000.0	120000.0
51.0	120000.0	150000.0
52.0	150000.0	180000.0
53.0	180000.0	220000.0
54.0	220000.0	280000.0
55.0	280000.0	350000.0
56.0	350000.0	450000.0
57.0	450000.0	580000.0
58.0	580000.0	750000.0
59.0	750000.0	950000.0
60.0	950000.0	1200000.0
61.0	1200000.0	1500000.0
62.0	1500000.0	1800000.0
63.0	1800000.0	2200000.0
64.0	2200000.0	2800000.0
65.0	2800000.0	3500000.0
66.0	3500000.0	4500000.0
67.0	4500000.0	5800000.0
68.0	5800000.0	7500000.0
69.0	7500000.0	9500000.0
70.0	9500000.0	12000000.0
71.0	12000000.0	15000000.0
72.0	15000000.0	18000000.0
73.0	18000000.0	22000000.0
74.0	22000000.0	28000000.0
75.0	28000000.0	35000000.0
76.0	35000000.0	45000000.0
77.0	45000000.0	58000000.0
78.0	58000000.0	75000000.0
79.0	75000000.0	95000000.0
80.0	95000000.0	120000000.0
81.0	120000000.0	150000000.0
82.0	150000000.0	180000000.0
83.0	180000000.0	220000000.0
84.0	220000000.0	280000000.0
85.0	280000000.0	350000000.0
86.0	350000000.0	450000000.0
87.0	450000000.0	580000000.0
88.0	580000000.0	750000000.0
89.0	750000000.0	950000000.0
90.0	950000000.0	1200000000.0
91.0	1200000000.0	1500000000.0
92.0	1500000000.0	1800000000.0
93.0	1800000000.0	2200000000.0
94.0	2200000000.0	2800000000.0
95.0	2800000000.0	3500000000.0
96.0	3500000000.0	4500000000.0
97.0	4500000000.0	5800000000.0
98.0	5800000000.0	7500000000.0
99.0	7500000000.0	9500000000.0
100.0	9500000000.0	12000000000.0

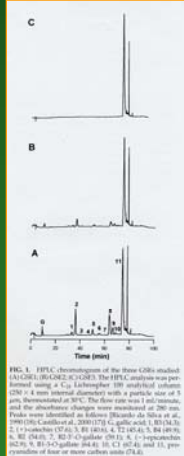


Fig. 3: Magnitude of protection of treatments in relation to irradiation.

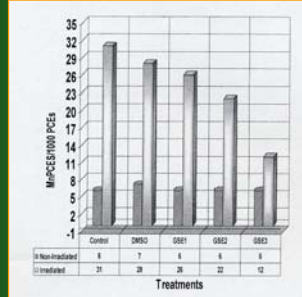


Fig. 2: Influence of treatments on the frequency of micronuclei in human lymphocytes irradiated and non-irradiated with gamma-rays. MN/500 PCEs, micronucleated erythrocytic erythrocytes; PCEs, polychromatic erythrocytes.

## RESULTS

**gamma-Ray radioprotective effects: anticlastogenic activity:** Fig. 2 shows specifically the influence of treatment on the frequency of micronuclei in nonirradiated and irradiated human lymphocytes, permitting a comparison of the potential toxicity of each treatment with its anticlastogenic activity. GSEs showed the same level of micronuclei as the control, and the sulfur compound DMSO showed higher toxicity than GSEs. The order of treatments with respect to the minor level of micronuclei generated after irradiation was GSE3 < GSE2 < GSE1 < DMSO. DMSO was included in this study because it is generally considered to be a classic radical scavenger and radioprotective agent according to structural and experimental data. The radioprotective effects and, consequently, the anticlastogenic activity of the treatments used were established according to the increase of micronuclei in treated human blood after irradiation and its relation with the level of micronuclei in irradiated blood control; as described earlier, a percentage value was calculated that determined the magnitude of protection of each treatment. Fig. 3 shows the values of these protection capacities (i.e., the order of efficiency): GSE3 > GSE2 > GSE1 > DMSO.

## CONCLUSION

The higher antioxidant capacity and anticlastogenic activity of GSEs can be explained, structurally, by the high number of conjugated structures among the catechol groups in the B-rings and the 3-OH free groups of the polymeric polyphenolic skeleton and, in addition, by the stability of the aroxyl flavonoids radical generated in the processes.

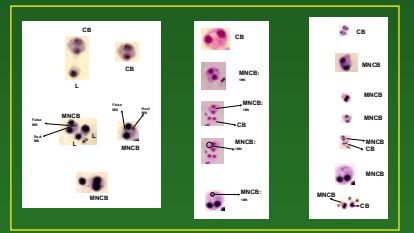
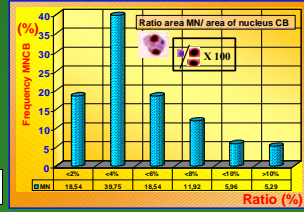
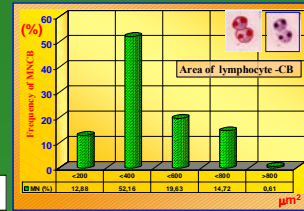


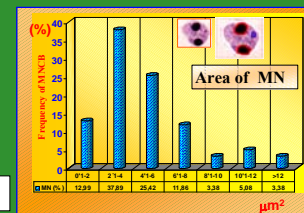
Fig. 6: Structural micronuclei: different cytochalasin blocked cells (CB: binucleated cells (cytokinesis-blocked cell); MNCS: binucleated blocked-cells with micronuclei ; L: lymphocyte).



a)

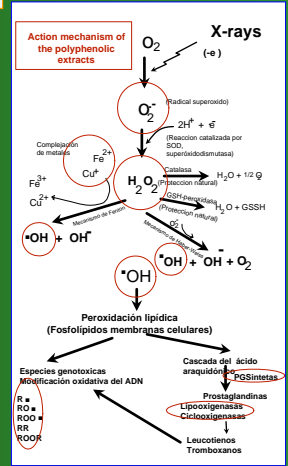


b)



c)

Fig. 7: Area of micronuclei in binucleated cells after "in vitro" gamma-irradiation: a) ratio area MN/area nucleus in binucleated blocked-cells (CB); b) area of binucleated cells (CB); c) area of MN.





# EFFECTO PROTECTOR DE PROCIANIDINAS FRENTE AL DAÑO GENOTÓXICO INDUCIDO "IN VITRO" POR RADIACIÓN GAMMA.



C. Martínez<sup>1</sup>, R. Martín-Gil<sup>1</sup>, M. Alcaraz<sup>1</sup>, J. Castillo<sup>2</sup>, O. Benavente-García, J<sup>2</sup>. Lorente<sup>2</sup>, V. Vicente<sup>3</sup> y M. Canteras<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Radiología y Medicina Física, <sup>3</sup>Departamento de Anatomía Patológica, <sup>4</sup>Departamento de Bioestadística. Universidad de Murcia. 30100-Espinardo.(Murcia) (mab@um.es).  
<sup>2</sup>Departamento de Investigación y Desarrollo de Furfural Español S.A.

## INTRODUCCIÓN

El test de los micronúcleos (MN) con bloqueo citogenético (CB) descrito por Fenech (1985) se utiliza para valorar el daño cromosómico (genotóxico) inducido por diferentes agentes químicos y físicos.

## OBJETIVO

Determinar un posible efecto protector de diferentes preparados de procianidinas frente al daño genotóxico inducido "in vivo" por radiación gamma, mediante el test de micronúcleos en cultivos de linfocitos humanos irradiados con bloqueo citocinético.

## MATERIAL Y METODO

Se ha estudiado un efecto protector de diferentes sustancias polifenólicas frente al daño cromosómico inducido por radiación gamma mediante el test de micronúcleos en cultivos de linfocitos humanos mediante la técnica de Bloqueo Citocinético (BC).

Para ello, se han utilizado muestras sanguíneas de donantes sanos, con las que se han realizado dos tipos de experiencias: a) la obtención de una curva dosis-respuesta, para determinar la frecuencia de aparición de micronúcleos inducida por irradiación gamma; b) ensayo de diferentes sustancias (diosmina, rutina, eriodictiol, ácido ascórbico, dimetilsulfóxido (DMSO)), así como cuatro tipos de procianidinas (P90, GSE1, GSE2, GSE3), a diferentes concentraciones, para determinar un posible efecto protector frente a la lesión genotóxica inducida por 2 Gy de radiación gamma.

Las sustancias ensayadas se han administrado de dos formas diferentes: 1) antes de la exposición a la radiación ionizante (Grupo Preirradiación), y 2) inmediatamente después de la irradiación (Grupo Postirradiación).

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran una relación lineal en la curva dosis-respuesta. La exposición a la radiación gamma provoca un incremento significativo en la frecuencia de aparición de MNCB en comparación con la frecuencia espontánea ( $p < 0,001$ ). La administración de las sustancias estudiadas no provoca diferencias respecto de los animales controles no irradiados. Se aprecian diferencias significativas en la reducción de MN/500CB en las muestras previamente tratadas antes de la irradiación respecto de las muestras controles irradiadas, pudiéndose establecer estadísticamente que: Controles  $\approx$  Quercetina  $>$  rutina  $>$  vitamina C  $\approx$  EC  $\approx$  Diosmina  $>$  GSE. Las procianidinas ensayadas producen una disminución significativa de la frecuencia de MN esperada tras la irradiación ( $p < 0,01$ ), siendo mayor con GSE-1 a la concentración de 120  $\mu\text{g/ml}$ , y con GSE-PS a la de 60  $\mu\text{g/ml}$ . Se puede determinar una protección del 50 % en las muestras tratadas con GSE, frente a las muestras controles irradiadas. La administración de las sustancias inmediatamente postirradiación presentan un nivel de protección significativamente menor que cuando la administración se realiza antes de proceder a la irradiación.

## CONCLUSIÓN

Por tanto, las dos procianidinas ensayadas (GSE-1 y GSE-PS) son las que presentan un mayor porcentaje de protección frente al daño genotóxico inducido por la radiación gamma, posiblemente debido a su capacidad antioxidante y "eliminadora" de radicales libres.

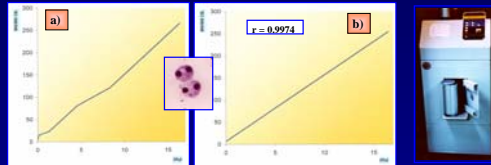


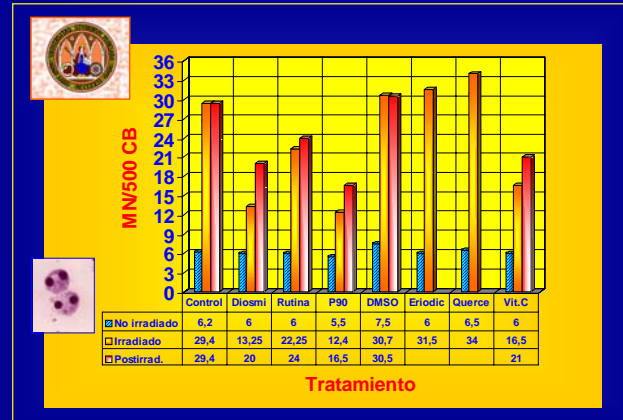
Fig. 1. Curva Dosis-Efecto para la inducción de micronúcleos por exposición a radiación gamma "in vitro" (MN/500 CB) (0-16.262 Gy): a) curva obtenida; b) curva esperada.



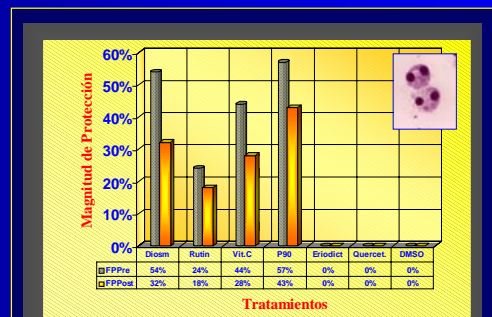
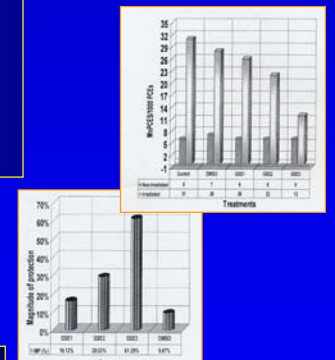
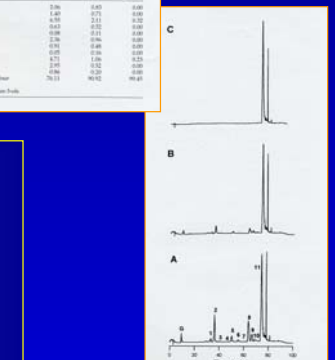
### Material y método

Técnica de MN en cultivo de linfocitos con bloqueo citocinético (FENECH y MORLEY 1985, 2000)

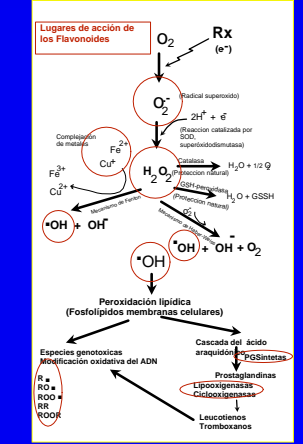
Table 1. 1H NMR Spectra (Chemical Shifts, Integration Area, Coupling constants) for 1H NMR spectra (Proton in ppm) from 0 to 10. Includes columns for Shift, Int., and Coupling constants.



Treatment	No irradiado	Irradiado	Postirrad.
Control	6,2	29,4	29,4
Diosmi	6	13,25	20
Rutina	6	22,25	24
P90	5,5	12,4	16,5
DMSO	7,5	30,7	30,5
Eriodic	6	31,5	31,5
Querce	6,5	34	34
Vit.C	6	16,5	21



Magnitud de protección (%) =  $((F_{\text{control}} - F_{\text{tratado}}) / F_{\text{control}}) \times 100$ .  
Donde  $F_{\text{control}}$  = frecuencia de MNPCEs en animales irradiados.  
 $F_{\text{tratado}}$  = frecuencia de MNPCEs en animales tratados antes de la irradiación con rayos X.





# EFFECTO PROTECTOR DE DIFERENTES FLAVONOIDES FRENTE AL DAÑO GENOTÓXICO INDUCIDO "IN VIVO" POR RAYOS X



C. Martínez<sup>1</sup>, R. Martín-Gil<sup>1</sup>, M. Alcaraz<sup>1</sup>, J. Castillo<sup>2</sup>, O. Benavente-García<sup>2</sup>, J. Lorente<sup>2</sup>, V. Vicente<sup>3</sup> y M. Canteras<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Radiología y Medicina Física, <sup>3</sup>Departamento de Anatomía Patológica, <sup>4</sup>Departamento de Bioestadística. Universidad de Murcia. 30100-Espinardo (Murcia) (mab@um.es). <sup>2</sup>Departamento de Investigación y Desarrollo de Furfural Español S.A.

## INTRODUCCIÓN

El test de micronúcleos "in vivo" es un método descrito originariamente para la detección de alteraciones cromosómicas provocadas por sustancias químicas. Las sustancias se administran a pequeños roedores, y su efecto se analiza directamente sobre preparaciones microscópicas de su médula ósea. El ensayo de micronúcleos sobre eritrocitos policromatófilos de médula ósea (PCEs), desarrollado por Schmidt (1975), es probablemente el test más utilizado en el estudio genotóxico a corto plazo realizado "in vivo". El análisis de micronúcleos sobre PCEs es un método simple para la detección del daño cromosómico producido por agentes químicos y físicos (Heddle y Salamone, 1981; Almasy et al., 1987; Mavournin et al., 1990; Krishna et al., 1992; Mazur, 1995). El ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón es probablemente el test más significativo en términos de riesgo humano (Ashby et al., 1997).

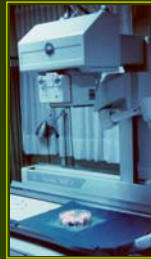


Fig. 1: Detalle de la irradiación. Los animales se exponen a una dosis única de 48 cGy.



Fig. 2: Detalle de la exposición.



Fig. 4: El fémur se extrae a las 24 horas de la irradiación y las células de la médula ósea son resuspendidas para su estudio microscópico.



Fig. 3: Algunas sustancias se administran directamente en la luz gástrica 6 h antes de la exposición a los rayos X.

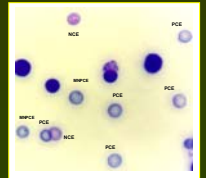


Fig. 5: Las preparaciones se tiñen con May-Grünwald/Giemsa. El número de eritrocitos policromatófilos micronucleados (MnPCEs) por cada 2000 eritrocitos policromatófilos (PCEs) se determinan en cada animal.

## OBJETIVO

Determinar un posible efecto protector de diferentes preparados de procianidinas frente al daño genotóxico inducido "in vivo" por rayos X, mediante el test de micronúcleos en médula ósea de ratón.

## MATERIAL Y METODO

**Animales:** Ratones Swiss machos (9-12 semanas de edad) con un peso de 25-30 g se han alimentado con una dieta standard (Rodent toxicology diet<sup>®</sup>, BYK Universal, Francia) y agua "ad libitum". Cada punto experimental corresponde a los resultados de 6 animales.

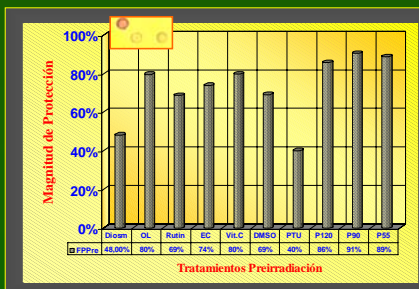
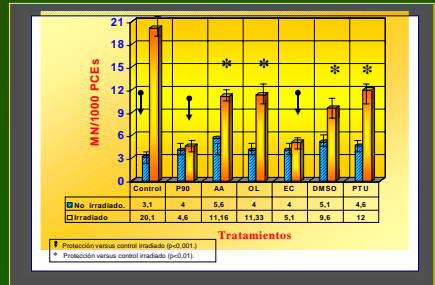
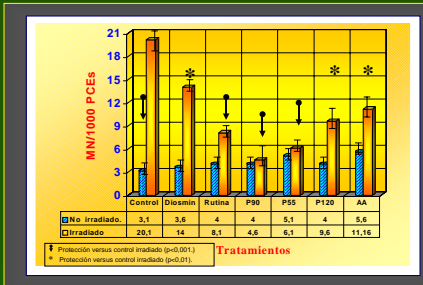
**Sustancias y Tratamiento:** Los extractos polifenólicos se han administrado oralmente. Todas las preparaciones se han preparado inmediatamente antes de la administración a los animales: Extracto de Uva (GSE), Extracto cítrico (CE), Extracto de Oliva (OL) y 6n-propyl-2-thiouracil (PTU) se han disueltos al 0.2 % en el agua de bebida administrados durante los cinco días previos a la irradiación. El DMSO se ha disuelto en agua (5 g/100 ml). La diosmina y la rutina se han disueltos en DMSO (300 mg/ml). DMSO, diosmina and rutina se han inyectado directamente en la luz gástrica tras la intubación esofágica con una dosis única de 0.6 ml, 6h antes de la irradiación.

**Exposición a rayos X:** La exposición de los animales de ha realizado por exposición corporal total utilizando un aparato CGR con radioscopia (General Electric, España) con 120 kV, 1.4 mA, filtro 2.5 mm Al, rendimiento de 2 cGy/min, FOD 100 cm. Los ratones se han expuesto a una dosis única de 48 cGy. La dosis utilizada se ha determinado utilizando dosimetría de termoluminiscencia (TLDs) (GR-200<sup>®</sup> Conqueror Electronics Technology Co.Ltd., China).

**Test de Micronúcleos:** El test de micronúcleos sobre PCEs de médula ósea se ha realizado utilizando la técnica descrita por Schmidt (1975). Los dos fémurs de cada animal se han diseccionado 24 h después de la irradiación and las células de la médula ósea se han obtenido por lavado con suero calcico fetal, se han dispersado centrifugadas y resuspendidas posteriormente. Las preparaciones se han teñido con May-Grünwald/Giemsa. Se ha determinado el número de eritrocitos policromatófilos micronucleados (MnPCEs) sobre 2000 PCEs en cada animal. La ratio de PCEs/Erythrocytes (eritrocitos policromatófilos + normocromatófilos) también se ha establecido para determinar el efecto tóxico de las sustancias ensayadas. Las diferencias en la frecuencia de aparición de MnPCEs/1000 PCEs y PCEs por 1000 eritrocitos (PCEs + NCEs) se han sometido al análisis de varianza.

## RESULTADOS

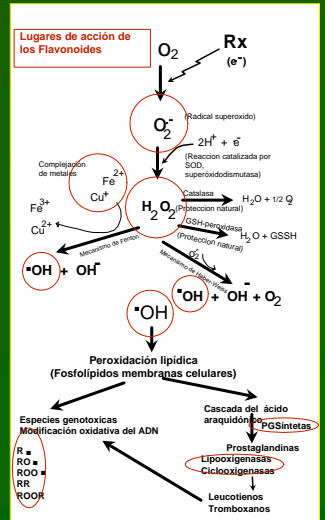
Los resultados ponen de manifiesto una reducción significativa de los MnPCEs/1000 PCEs con todas las sustancias ensayadas, siendo mayor con los tres tipos de procianidinas utilizadas (p<0,001).



Magnitud de protección (%) =  $((F_{control} - F_{tratado}) / F_{control}) \times 100$ .  
Donde  $F_{control}$  = frecuencia de MnPCEs en animales irradiados.  
 $F_{tratado}$  = frecuencia de MnPCEs en animales tratados antes de la irradiación con rayos X.

## CONCLUSIÓN

Las procianidinas ensayadas (flavonas-ols) muestran efecto protector frente al daño cromosómico inducido por los rayos X, posiblemente por su capacidad eliminadora de radicales libres.







# ALTERACIONES CUTÁNEAS POR EXPOSICIÓN A UVA

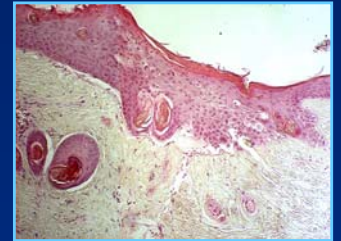
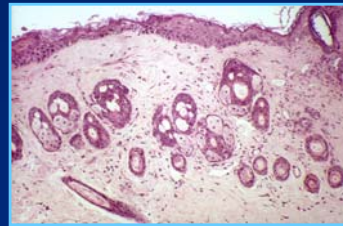
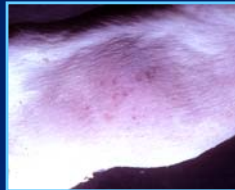
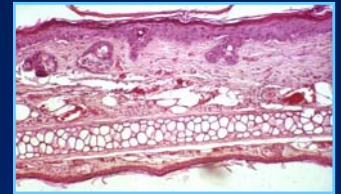
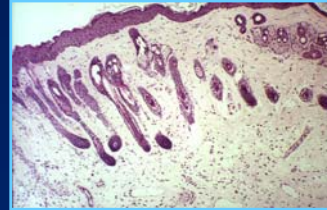


<sup>1</sup>V. VICENTE, <sup>1</sup>M. J. YÁNEZ, <sup>2</sup>M. ALCARAZ, <sup>1</sup>V. BOLARÍN, <sup>3</sup>J. CASTILLO, <sup>3</sup>O. BENAVENTE-GARCÍA

Departamentos de <sup>1</sup>Anatomía Patológica. <sup>2</sup>Radiología. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. 30100.Espinardo.Murcia. <sup>3</sup>Departamento de I+D de Furfural Español. Murcia.

## INTRODUCCIÓN

Las radiaciones ultravioletas son responsables del fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis cutáneas, fundamentalmente la B; mientras que a la radiación ultravioleta A se la considera responsable del 10-20% de la dosis carcinogénica. Entre los protectores químicos se están ensayando sustancias naturales como los flavonoides.



## OBJETIVO

Establecer un modelo experimental de alteraciones cutáneas por radiaciones UVA y ensayar el efecto protector del ácido rosmarínico.



## MATERIALY MÉTODOS

**Animales:** 30 ratones Swiss hembras de 10-12 semanas de edad, procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia (Licencia 30030-2AB), que se distribuyeron en cinco grupos: I (control sin exposición), II (control irradiado), III (se les administró diariamente ácido rosmarínico al 2% en el agua y la comida y tópicamente 30 minutos antes de la irradiación sobre la piel y orejas al 4% en agua/glicerina), IV (aplicación tópica de TPA disuelto en acetona (2,5 µg/dosis) en la región dorsal y orejas de los ratones) y V aplicación tópica del promotor tumoral como en el grupo IV 1 hora antes de la exposición a UVA).

**Exposición:** Los grupos II, III y IV fueron expuestos a radiación UVA (previamente rasurados 48 horas antes) utilizando un solarium facial Philips Typ1 HB 171/A (compuesta por cuatro tubos Philips Cleo 15 w, con un espectro de emisión de 300-425 nm y un máximo de 354 nm). Los animales fueron expuestos durante 120 minutos por sesión (100 sesiones) y a una distancia de 20 cm de la fuente UVA.

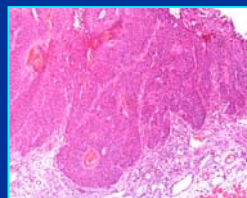
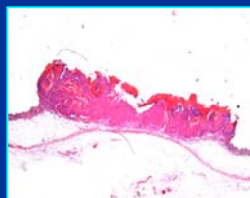
## RESULTADOS

Los animales del grupo IV tratados exclusivamente con el promotor tumoral (TPA) no presentaron alteraciones relevantes, de modo similar al control (grupo I).

Todos los animales expuestos exclusivamente a UVA (grupo II) presentaron displasia moderada o severa. En el grupo irradiado tras la aplicación del promotor tumoral todos los animales presentaron displasia más carcinoma espinocelular en el 40% de los ratones.; mientras que el grupo tratado con el ácido rosmarínico por vía tópica y oral antes de la irradiación solo presentaron displasia leve en el 30% de los animales.

## CONCLUSIÓN

La exposición a radiación ultravioleta A provocó displasia moderada o severa y cuando se aplicó el promotor tumoral carcinoma espinocelular. El ácido rosmarínico actuó como protector frente a las lesiones originadas por UVA.



# RADIOPROTECTIVE EFFECTS OF FLAVONOIDS AGAINST TO CHROMOSOMAL DAMAGE: RELATION BETWEEN THE STRUCTURE AND ACTIVITY.



M. Alcaraz<sup>1</sup>, C. Acevedo<sup>1</sup>, O. Benavente-García<sup>4</sup>, J. Castillo<sup>4</sup>, V. Vicente<sup>2</sup>, M. Canteras<sup>3</sup>



<sup>1</sup>Department of Radiology and Physical Medicine, <sup>2</sup>Pathology and <sup>3</sup>Biostatistics. University of Murcia. 30100-Espinaro, Murcia, Spain (mab@um.es).  
<sup>4</sup>Research and Development Department of Furfural Español S.A. Camino Viejo de Pliego s/n. 80320 Alcantarilla. Murcia. Spain.

## INTRODUCTION

The micronucleus test *in vivo* is a method devised primarily for screening chemicals for chromosome-breaking effects. The test substances are normally applied sub-acutely to small mammals, and the effect is read in direct smears from bone marrow. The micronucleus assay on mouse bone marrow polychromatic erythrocytes, originally developed by Schmidt (1975), is probably the most frequently used *in vivo* short-term genotoxicity tests. Bone marrow micronucleated erythrocytes provide a simple and rapid method for detection of chromosomal damage by chemical and physical agents (Heddle and Salamone, 1981; Almasy et al., 1987; Mavournin et al., 1990; Krishna et al., 1992; Mazur, 1995). The mouse bone marrow MN assay results are probably the most significant in terms of potential human hazard (Ashby et al., 1997). An increase in the frequency of micronucleated PCEs is, therefore, an indication of aneuploidy or clastogenicity induction. For this reason, micronuclei have been widely used to detect chromosomal breakage and chromosome lagging "in vivo" and "in vitro" (Watanabe et al., 1997; Kiersch-Volders, 1997).

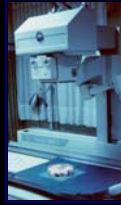


Fig. 3: Detail of X-irradiation. The mice were exposed to a single dose of 48 cGy.



Fig. 4: DMSO, diosmin and rutin were injected directly into the lumen gastric before the X-irradiation.



Fig. 5: Two femurs were removed from each mouse 24 h after X-irradiation and the bone marrow cells were collected by centrifugation and re-suspended.



Fig. 6: The slides were stained with May-Grünwald/Giemsa. The number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MnPCEs) among 2000 polychromatic erythrocytes (PCEs) per mouse were determined.



Fig. 7: The ratio of PCEs/Erythrocytes (polychromatic -PCEs- + normochromatic erythrocytes -NCEs-) was also determined to assess the cytotoxic effect of substances.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals:** Male Swiss mice (9-12 weeks old) weighing 29-32 g were used for the experiments. All animals received a standard diet (Rodent toxicology diet®.BYK Universal, France) and tap water "ad libitum". For each experimental point 6 mice were used.

**Chemicals and Treatment:** The polyphenolic extracts were administered orally. All solutions were freshly prepared directly before treatment of the animals: Grape Seeds Extract (GSE), Citrus Fruit Extract (CE), Olive Leaf Extract (OL) and 6n-propyl-2-thiouracil (PTU) were dissolved in 0.2 % drinking water and administered during 5 days before the X-irradiation. DMSO was dissolved in water (50 g/100 ml). Diosmin and rutin were dissolved in DMSO (300 mg/ml). DMSO, diosmin and rutin were injected by oesophageal tube at a single dose of 0.6 ml directly into the lumen gastric 6h before the X-irradiation.

**Exposure to X-rays:** The mice were whole-body X-irradiated using CGR apparatus with radioscopy (General Electric, Spain) with 120 kV, 1.4 mA, filter 2.5 mm Al, exposure rate of 2 cGy/min, FOD 100 cm. The mice were exposed to a single dose of 48 cGy. The X-rays exposure was established by means of thermoluminescent dosimeters (TLDs) (GR-200®, Conqueror Electronics Technology Co.Ltd, China). The TLDs were supplied and measured by CIEMAT (Ministry of Industry and Energy, Spain)

**Micronucleus Test:** The micronucleus test on the bone marrow cells was performed according to Schmidt (1975). Two femurs were removed from each mouse 24 h after X irradiation and the bone marrow cells were gently flushed out with fetal calf serum, they were dispersed, collected by centrifugation and re-suspended. The slides were stained with May-Grünwald / Giemsa. The number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MnPCEs) among 2000 PCEs per mouse were determined. The ratio of PCEs/ Erythrocytes (polychromatic + normochromatic erythrocytes) was also determined to assess the cytotoxic effect of substances. Differences in the incidence per animal of MnPCEs/1000 PCEs and PCEs per 1000 erythrocytes (PCEs + NCEs) were tested by analysis of variance.

## RESULTS

The data presented show that whole-body exposure to 48 cGy of X-rays results in a substantial increase in the frequency of MnPCEs in comparison with that occurring spontaneously (p<0.001). There is a significant reduction of frequency of MnPCEs in all pre-treated irradiated groups compared with the control and irradiated group.

Figure 1 shows the influence of treatments on the frequencies of MnPCEs in bone marrow of animals non-irradiated and irradiated, thus permitting a comparison of the potential toxicity of each treatment versus their anticlastogenic activity. Diosmin, rutin, GSE, CE and OL show very low levels of MnPCEs generation, similar with respect to non-irradiated control data. Also, Figure 1 shows the influence of X-rays irradiation on the frequencies of MnPCEs in mouse bone marrow. There is a significant reduction of frequency of MnPCEs in the pre-treated groups compared with the irradiated control group. The order of treatments with respect to the minor level of MnPCEs generated after irradiation is: GSE < CE < rutin < DMSO < OL = PTU = Vit C < diosmin. The radioprotective effects and consequently the anticlastogenic activity of the different treatments used, was established according to the increase of MnPCEs level in animals after irradiation and their relation with this level in the control animals, obtaining a percentage value that determines the level of protection of each treatment. Figure 2 shows the values of these protection capacities, the GSE-pre-treated group being the most effective protection against "in vivo" chromosomal damage and citotoxicity induced by X-rays. The order of effectivity was: GSE > CE > rutin > DMSO > OL = PTU = Vit C > diosmin.

## CONCLUSION

The studied substances show significant protection against genetic damage caused by radiation, possibly due to their higher capacity for eliminating free radicals induced by radiation, precisely at doses free of toxic side effects, which means a significant difference to the rest of known radioprotective substances.

GSE < CE < rutin < DMSO < OL = PTU = Vit.C < diosmin

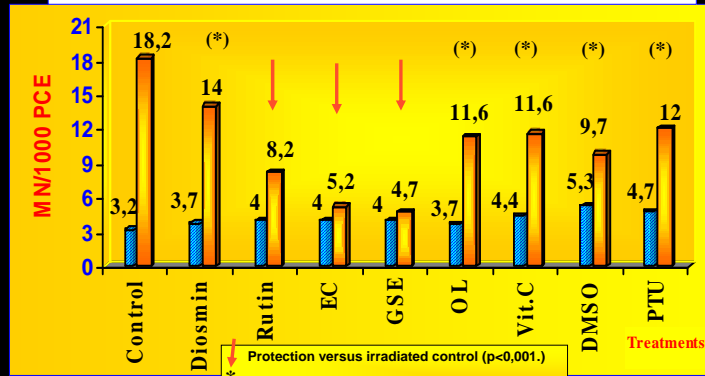


Fig. 1: Influence of treatments and X-rays irradiation on the frequencies of MnPCEs in mouse bone marrow (irradiated (yellow) and non-irradiated (blue)).

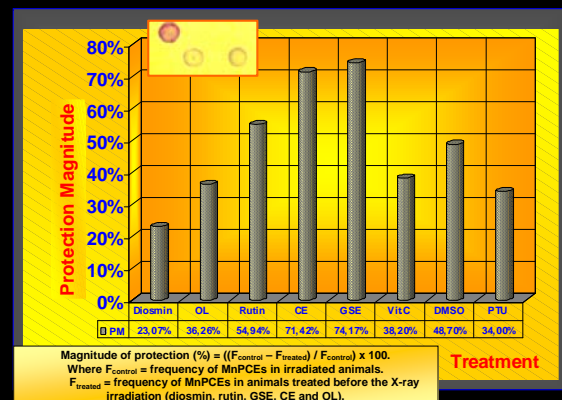


Fig. 2: Level of protection of different treatments in relation to irradiation with X-rays.



# DOSIS EQUIVALENTE CORPORAL TOTAL TRAS EL TRATAMIENTO CON <sup>131</sup>IODO EN EL CANCER DE TIROIDES.



Navarro JL\*, Alcaraz M\*, Claver MA\*\*, Acevedo C\*, Contreras J\*\*, Nicolás F\*\*, Nuño de la Rosa\*\*, JA.

\*Departamento de Radiología y Medicina Física. Universidad de Murcia\*. \*\*Departamento de Medicina Nuclear. Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca". Murcia. España.

## INTRODUCCIÓN

El test de los micronúcleos (MN) con bloqueo citogenético (CB) descrito por Fenech (1985) se utiliza para valorar el daño cromosómico (genotóxico) inducido por diferentes agentes químicos y físicos.

## OBJETIVO

Valorar el efecto genotóxico de la terapia con I-131 en pacientes con cáncer de tiroides y determinar la dosis equivalente de radiación ionizante corporal total (DECT) que puede suponer éste tratamiento radiológico en dichos pacientes.

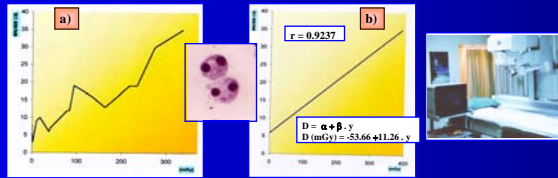


Fig. 1: Curva Dosis-Efecto para la inducción de micronúcleos por exposición a rayos X "in vitro" (MN/500 CB) (0-335 mGy): a) curva obtenida; b) curva esperada.

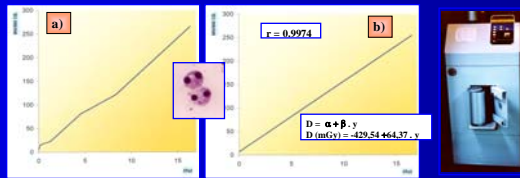


Fig. 2: Curva Dosis-Efecto para la inducción de micronúcleos por exposición a radiación gamma "in vitro" (MN/500 CB) (0-16362 Gy): a) curva obtenida; b) curva esperada.

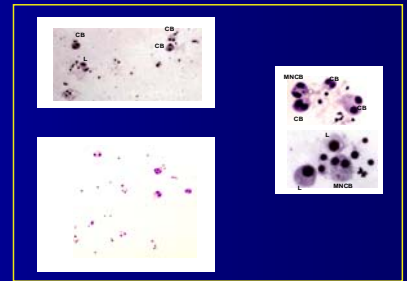


Fig. 3: Presentación de los micronúcleos en linfocitos humanos irradiados en diferentes preparaciones microscópicas: CB: células binucleadas (cytokinesis-blocked cell); MN/CB: células binucleadas con micronúcleos; L: linfocito.

## MATERIAL Y METODO

Se ha determinado la frecuencia de aparición de micronúcleos (MN) en cultivos de linfocitos con bloqueo citogenético (CB) mediante la técnica descrita por Fenech y Morley (1985;2000) en tres grupos de individuos diferentes: 1) en 35 voluntarios sanos para establecer la frecuencia espontánea de aparición de MN; 2) en 9 voluntarios supuestamente sanos para realizar las curvas dosis-efecto tanto para radiación gamma (rango de dosis entre 0-16 Gy) como para rayos X (rango de dosis entre 0-335 mGy); y 3) en 25 pacientes (3 varones/16 mujeres) y que han recibido una dosis ablativa de 100 mCi de I-131 en el tratamiento de un carcinoma de tiroides (16 papilares, 7 foliculares, 2 medular). Se ha determinado el número de MN/500 CB previo al tratamiento y tres días después de la administración del I-131. La DECT tras la terapia con I-131 se ha calculado por el número de MN en sangre del paciente tres días de administración y comparada con la dosis de radiación X y gamma expuestas "in vitro" que produciría una idéntica frecuencia de MN/500 CB.

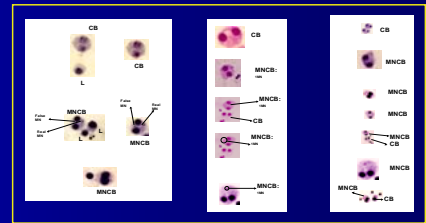


Fig. 4: Estructura del micronúcleo: diferentes tipos de células con bloqueo citogenético (CB: células binucleadas; MN/CB: células binucleadas con micronúcleos; L: linfocito).

## RESULTADOS

Se ha obtenido una relación lineal (D = a + b.y) entre la frecuencia de MN y la dosis de radiación ionizante administradas "in vitro". En 24 de los 25 pacientes se ha puesto de manifiesto un aumento de MN tras la administración del I-131 (96 %: 24/25), que muestra significación estadística (p<0,01) respecto de las muestras previas tomadas antes del tratamiento. La frecuencia de MN tras el tratamiento con I-131 (7'89 MN/500CB; 0'158 MN/CB) ha duplicado la frecuencia espontánea (3'79 MN/500CB; 0'0076 MN/CB). La DECT determinada en este estudio es de 136'916 mGy en su comparación con las frecuencias determinadas "in vitro" para radiación gamma.

PACIENTES	Edad	Sexo	Patología	TOTAL MN	TOTAL MN
1	59	V	CA MEDULAR	5	13
2	30	M	CA MEDULAR	4	12
3	53	M	CA. PAPILAR	4	7
4	64	M	CA. FOLICULAR	3	12
5	53	M	CA. PAPILAR	3	10
6	67	M	CA. PAPILAR	4	8
7	18	M	CA. PAPILAR	3	11
8	49	M	CA. PAPILAR	4	10
9	37	M	CA. PAPILAR	3	7
10	49	M	CA. PAPILAR	2	9
11	52	M	CA PA FOL	7	10
12	25	M	CA. PAPILAR	5	4
13	49	M	CA. FOLICULAR	5	9
14	57	M	CA. PAPILAR	3	9
15	24	M	CA. PAPILAR	4	5
16	40	M	CA. PAPILAR	6	7
17	36	M	CA. FOLICULAR	3	6
18	47	M	CA. PAPILAR	5	6
19	32	V	CA. PAPILAR	2	7
20	56	M	CA. FOLICULAR	5	8
21	25	V	CA. PAPILAR	5	8
22	56	M	CA. PAPILAR	5	13
23	11	V	CA. PAPILAR	5	12
24	45	M	CA. PAPILAR	3	8
25	37	M	CA. FOLICULAR	4	9

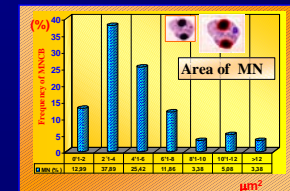
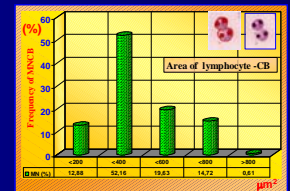
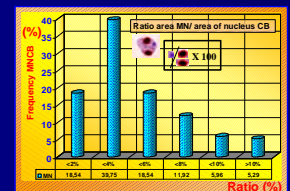


Fig. 5: Área de los micronúcleos en las células binucleadas tras la irradiación gamma: a) relación entre el área del MN/área del núcleo en las células binucleadas (CB); b) área del núcleo en las células binucleadas (CB); c) área del micronúcleo ( MN).

## CONCLUSIÓN

La terapia con I-131 induce un incremento significativo del daño cromosómico en los pacientes irradiados por carcinoma de tiroides, equivalente a una dosis corporal total de 13 cGy durante los tres primeros días de la administración terapéutica del I-131.

Fig. 6: Número de micronúcleos (MN) en células binucleadas (BC) en los pacientes irradiados por carcinoma de tiroides. Determinación de la dosis equivalente corporal total que supone dicho tratamiento al aplicar las curvas dosis-efecto obtenidas "in vitro" para radiación X y gamma.

**D = alpha + beta.Y**

Para radiación gamma:  
D (mGy) = - 429.54 + 64.37.Y  
D (mGy) = 136.916 mGy

Para rayos X:  
D (mGy) = - 53.66 + 11.26 .Y  
D (mGy) = 45.4 mGy

# EFFECTO GENOTÓXICO DE DIFERENTES PROCEDIMIENTOS MÉDICOS INDUCIDOS POR RADIACIÓN IONIZANTE.

M. Alcaraz<sup>1</sup>, G. Fonseca<sup>2</sup>, C. Acevedo<sup>1</sup>, J.L. Navarro<sup>1</sup>, D. Armero<sup>3</sup>, J.J. López-Sabater<sup>4</sup>, V. Vicente<sup>5</sup> y M. Canteras<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Radiología y Medicina Física, <sup>3</sup>de Enfermería, <sup>4</sup>de Estomatología, <sup>5</sup>de Anatomía Patológica y <sup>6</sup>de Bioestadística de la Universidad de Murcia. 30100-Espinarido (Murcia).  
<sup>2</sup>Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

## INTRODUCCIÓN

El test de los micronúcleos (MN) con bloqueo citocinético (CB) se emplea para valorar el daño cromosómico inducido por diferentes agentes químicos y físicos.

## OBJETIVO

Se pretende determinar la existencia de un efecto genotóxico debido a las dosis de radiación (rayos X) administradas en exploraciones complejas de radiodiagnóstico y medicina nuclear, así como valorar el efecto genotóxico y alteraciones cromosómicas inducidas por la terapia con I-131 en pacientes con cáncer de tiroides. También se pretende determinar la dosis equivalente de radiación ionizante corporal total (DECT) que puede suponer éste tratamiento radiológico en dichos pacientes.

## MATERIAL Y MÉTODO.

Se ha determinado la frecuencia de aparición de micronúcleos (MN) en cultivos de linfocitos con bloqueo citocinético (CB) mediante la técnica descrita por Fenech y Morley (1985;2000) en cinco grupos de individuos diferentes: 1) en 35 voluntarios sanos para establecer la frecuencia espontánea de aparición de MN; 2) en 9 voluntarios supuestamente sanos para realizar las curvas dosis-efecto tanto para radiación gamma como para rayos X; 3) 25 pacientes a los que se les ha realizado algún procedimiento radiológico complejo (arteriografías, coronariografías, urografías i.v.); 4) en 25 pacientes que han recibido una dosis ablativa de 100 mCi de I-131 en el tratamiento de un carcinoma de tiroides; y 5) En 25 pacientes sometidos a estudios diagnósticos con isótopos radiactivos en estudios de gammagrafía. El cultivo de linfocitos con bloqueo citocinético (CB) se ha realizado utilizando la técnica descrita por FENECH y MORLEY (1986).

Se ha determinado el número de MN/500 CB previo al tratamiento y tres días después de la administración del I-131. La DECT tras la terapia con I-131 se ha calculado por el número de MN en sangre del paciente tres días de administración y comparada con la dosis de radiación X y gamma expuestas "in vitro" que produciría una idéntica frecuencia de MN/500 CB. Realizándose el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

## RESULTADOS.

Los resultados muestran una relación de dependencia entre la frecuencia de MN y la dosis de radiación administrada con un aumento significativo de MN en las muestras irradiadas respecto de los controles ( $p < 0.01$ ). El contraste radiológico utilizado no presenta modificaciones significativas en la frecuencia de MN. Tampoco presentan diferencias significativas el sexo del paciente ni el hábito de fumar. No se han apreciado diferencias significativas en los pacientes sometidos a pruebas diagnósticas de Medicina Nuclear.

En el tratamiento del cáncer de tiroides se ha puesto de manifiesto un aumento de MN tras la administración del I-131 ( $p < 0,01$ ) respecto de las muestras previas tomadas antes del tratamiento. La DECT determinada en este estudio es de 136'916 mGy en su comparación con las frecuencias determinadas "in vitro" para radiación gamma

## CONCLUSIÓN.

La utilización médica de la radiación ionizante en pruebas complejas de radiodiagnóstico y en el tratamiento del cáncer con yodo radiactivo supone un incremento en la aparición de micronúcleos como expresión del daño cromosómico inducido por la exposición a la radiación ionizante.

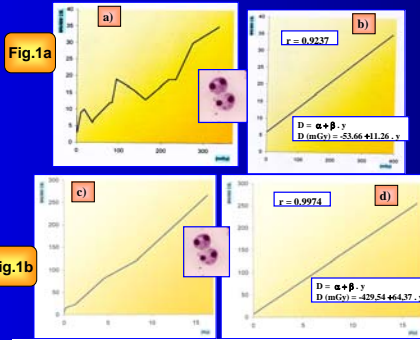


Fig. 1a: Curva Dosis-Efecto para la inducción de micronúcleos por exposición a rayos X "in vitro" (MN/500 CB) (0-335 mGy): a) curva obtenida; b) curva esperada.  
 Fig. 1b: Curva Dosis-Efecto para la inducción de micronúcleos por exposición a radiación gamma "in vitro" (MN/500 CB) (0-16362 Gy): c) curva obtenida; d) curva esperada.

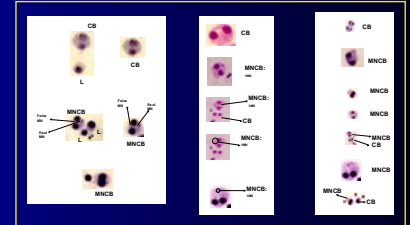


Fig. 2: Estructura del micronúcleo: diferentes tipos de células con bloqueo citogénético (CB: células binucleadas; MN:CB: células binucleadas con micronúcleo; L: Linfocito).

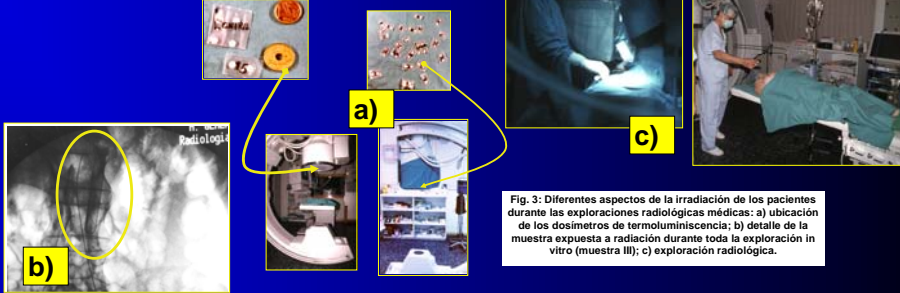


Fig. 3: Diferentes aspectos de la irradiación de los pacientes durante las exploraciones radiológicas médicas: a) ubicación de los dosímetros de termoluminiscencia; b) detalle de la muestra expuesta a radiación durante toda la exploración in vitro (muestra III); c) exploración radiológica.

Cód.	Edad (años)	Sexo	EXPLORACION	Familiar	Céls. CB contadas	Céls. sin MN	Céls. con MN	Distribución de Micronúcleos (CB)			Σ	Céls. CB contadas sin MN	Céls. CB con MN	Σ	Dosis (mGy)				
								1 MN	2 MN	3 MN									
1	21	V	Arteriografía de miembros inf.	SI	500	497	3	3			3	500	497	3	3	0,58			
2	26	V	Arteriografía de miembros inf.	-	500	497	3	3			3	500	496	4	3	1	5	0,38	
3	41	V	Coronariografía.	SI	500	496	4	4			4	500	489	11	10	2	14	17,32	
4	42	V	Arteriografía	-	500	496	4	4			4	500	497	3	3	3	4,24		
5	46	V	Coronariografía.	-	500	497	3	3			3	500	496	4	4	4	6,45		
6	48	V	Arteriografía	SI	500	498	2	2			2	500	498	2	2	2	4,77		
7	50	V	Coronariografía.	SI	500	496	4	4			4	500	497	5	5	5	4,28		
8	50	V	Arteriografía aortoaórtica	SI	500	497	3	3			3	500	496	4	4	4	1,21		
9	50	V	Coronariografía.	SI	500	496	4	4			4	500	494	6	5	1	7	9,45	
10	53	V	Arteriografía de miembros inf.	-	500	495	5	5			5	500	496	4	2	1	1	9	0,53
11	54	V	Arteriografía de miembros inf.	SI	500	496	4	4			4	500	493	7	6	1	8	1,51	
12	54	V	Colangiografía percutánea.	SI	500	491	9	7	2		11	500	493	7	5	2	9	4,19	
13	54	V	Coronariografía.	-	500	498	2	2			2	500	495	5	4	1	6	4,64	
14	60	V	Coronariografía.	SI	500	497	3	3			3	500	493	7	5	2	9	4,53	
15	60	V	Coronariografía.	SI	500	484	6	5	1		7	500	490	10	7	1	15	3,73	
16	62	V	Coronariografía.	-	500	489	11	11			11	500	491	9	9	9	9	2,10	
17	64	V	Urografía intravenosa.	-	500	489	11	10	1		12	500	486	14	14	20	3,22		
18	64	V	Urografía intravenosa.	-	500	493	7	7			7	500	492	8	6	2	10	0,65	
19	66	V	Colangiografía transcut.	SI	500	492	8	6	2		10	500	490	10	10	10	1,97		
20	67	V	Coronariografía.	-	500	479	21	19	2		23	500	485	15	14	1	16	1,88	
21	68	M	Coronariografía.	-	500	488	12	12			12	500	484	16	14	2	18	4,97	
22	72	V	Escleroplastia.	-	500	490	10	10			10	500	490	10	7	3	13	2,20	
23	77	V	Arteriografía.	SI	500	492	8	7		1	10	500	490	10	10	10	10	4,10	
24	82	M	Arteriografía renal.	-	500	495	7	7			7	500	495	5	5	5	5	0,71	
25	84	M	Arteriografía.	-	500	487	13	13			13	500	495	5	4	1	6	1,072	

Fig. 4: Número de micronúcleos (MN) en células binucleadas (BC) y distribución de BC que presentan uno o más micronúcleos en los pacientes irradiados durante exploraciones de radiodiagnóstico médico (Pre-irradiación: muestra I; Post-irradiación: muestra IV).

PACIENTES	Edad	Sexo	Patología	TOTAL MN	TOTAL MN
1	59	V	CA MEDULAR	5	13
2	30	M	CA MEDULAR	4	12
3	53	M	CA. PAPILAR	4	7
4	64	M	CA. FOLICULAR	3	12
5	53	M	CA. PAPILAR	3	10
6	67	M	CA. FOLICULAR	4	8
7	18	M	CA. PAPILAR	3	11
8	49	M	CA. PAPILAR	4	10
9	37	M	CA. PAPILAR	3	7
10	49	M	CA. PAPILAR	2	9
11	52	M	CA. PA.FOL.	7	10
12	25	M	CA. PAPILAR	5	4
13	49	M	CA. FOLICULAR	5	9
14	57	M	CA. PAPILAR	3	9
15	24	M	CA. PAPILAR	4	5
16	40	M	CA. PAPILAR	6	7
17	36	M	CA. FOLICULAR	3	6
18	47	M	CA. PAPILAR	5	6
19	32	V	CA. PAPILAR	2	7
20	56	M	CA. FOLICULAR	5	8
21	25	V	CA. PAPILAR	5	8
22	56	M	CA. PAPILAR	5	13
23	11	V	CA. PAPILAR	5	12
24	45	M	CA. PAPILAR	3	8
25	37	M	CA. FOLICULAR	4	9

**D = α + β.Y**

Para radiación gamma:  
 $D(mGy) = -429.54 + 64.37.Y$   
 $D(mGy) = 136.916 mGy$

Para rayos X:  
 $D(mGy) = -53.66 + 11.26.Y$   
 $D(mGy) = 45.4 mGy$

Fig. 5: Número de micronúcleos (MN) en células binucleadas (BC) en los pacientes irradiados por carcinoma de tiroides. Determinación de la dosis equivalente corporal total que supone dicho tratamiento al aplicar las curvas dosis-efecto obtenidas "in vitro" para radiación X y gamma.



# COURSE ON RADIOLOGICAL PROTECTION AND QUALITY ASSURANCE IN RADIOLOGY. TELE-EDUCATION COURSE: A POSSIBLE SOLUTION TO CONTINUED POSTGRADUATE TRAINING



M. Alcaraz<sup>1</sup>, P. Chico<sup>1</sup>, A. Saura Iniesta<sup>1</sup>, D. Armero<sup>2</sup>, V. Vicente<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>)Radiology and Physical Medicine Department, (<sup>2</sup>) Nursing Department and (<sup>3</sup>)Pathology Department, Faculty of Medicine, University of Murcia, 30100-Espinardo. Spain (mab@um.es).

## INTRODUCTION

The creation of an interdepartmental project subsidised by the Spanish Ministry of Education has made it possible to create a series of specific didactic materials on Radiological Protection and Quality Assurance in Medical Radiodiagnostic Practices, leading to the publication of a specific manual and practical notebook. As a result, this material now constitutes the working basis for those professionals exposed to ionising radiation who are following the first continuous tele-education training course in Spanish via the Internet on this subject. Interactive multimedia training and tele-education may become one of the alternatives that allow health science professionals to receive continuous training, if adequate content and aims have been established during undergraduate training

## OBJECTIVES

The basic aim was to provide the student with scientifically up to date and pleasant teaching material, making the learning process easier by use of the computer. Tele-education via the Internet was later added to the course and has been extended to other professionals who also use radiation from the point of view of medical diagnostic imaging.

## MATERIALS AND METHODS

The study consisted of three different stages:

- (1) In the first stage, the shortfalls and gaps in the teaching and learning process of our own students were identified, in order to create scientifically up to date and pleasant teaching material whose usefulness would be assessed with the same type of student a year later.
- (2) During the second stage, the test was published after being approved for publication by the University of Murcia Publications Service. A guideline text was drawn up, including a practical notebook with those quality control tests considered to be essential and a self-assessment test lacking those answers felt to be most appropriate. All the material assembled was also published in CD-Rom format.
- (3) Finally, an independent computer server was set up in the Radiology and Physical Medicine Unit of the University of Murcia, sponsored by the Experimental Radiology Research Group, which used its I.T. network (ATICA and SUMA programs) to provide coverage that allowed it to operate independently, with access control, downloads, notice board, IRC or chat rooms, FAQs, self-assessment programs and the possibility of sending practical answers, and different materials and publications give radiological protection and quality assurance. All this allowed the first tele-education course on Radiological Protection and Quality Assurance to be given over the Internet. However, the course offered two options in its first year of existence: physical attendance at the Faculty of Medicine and virtual attendance via the Internet.

## RESULTS

The course has been taken by 156 students: 28 graduates (5/6-year degree), 12 graduates (3-year degree), 23 specialists in radiodiagnosics, 6 nursing assistants and 87 students residing in 10 different countries: 5 European (Spain, Finland, Italy, Belgium and France) and 5 Latin American countries (Argentina (3 students), Cuba (3), Colombia (3), Mexico (2) and Paraguay (1)). In Spain, those taking part have come from the provinces of Vizcaya, Palma de Majorca, Badajoz, Albacete, Seville, Alicante, Madrid and Murcia. Only 3 students did not manage to pass the specific, compulsory progress tests, normally because they were unable to maintain Internet access for a variety of reasons.

At present, we are holding the 3<sup>rd</sup> edition of the tele-education course (October-December 2004). This edition has been officially approved to be regarded as free credits by the student within the improved study plans for Medicine, Dentistry, Nursing and Physiotherapy, as requested by the undergraduate students of said university degree courses themselves

## CONCLUSION

During the training cycles, the use of appropriate teaching materials determines the level of knowledge that can be reached and, possibly, the initial professional capacity of the students. Interactive multimedia teaching and tele-education allow us to increase the students' interest in subjects that have been seen as boring and difficult by health science students.

During the later period, when they have left university, tele-education can provide continued training that achieves the basic goals of Radiological Protection and Quality Assurance, allowing professionals to familiarise themselves with this type of content, which they do not generally see as being.



Guideline text for the students



Information of the course



Diploma of the educational Promotion course



# DEVELOPMENT OF INTRA-ORAL DENTAL RADIOLOGY AFTER THE ESTABLISHMENT OF NEW QUALITY CONTROL LEGISLATION IN SPAIN.



M. Alcaraz<sup>1</sup> M, Y. Martínez-Beneyto<sup>2</sup>, S. Jódar<sup>2</sup>, A.M. Saura-Iniesta<sup>1</sup>, E. Velasco<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Department of Radiology and Physical Medicine and <sup>2</sup>Department of Dentistry. Faculty of Medicine/Odontology. University of Murcia. 30100--Espinardo. Spain ([mab@um.es](mailto:mab@um.es)).  
<sup>3</sup>UTPR ASIGMA, S.L. Avda. America 2, 9º. 30202-Cartagena (Murcia), Spain.

## OBJECTIVE

The objectives of the present study were to determine the incorrect parameters that affect the radiation dose to which patients are exposed, to examine any changes in intraoral radiology practice during the five years following the introduction of the EU norm concerning radiological quality control and to evaluate the extent to which the recommendations are followed.

## MATERIALS AND METHODS

A total of 7,176 official reports on radiological standards in private dental surgeries, universities and hospital dentistry units covering the period 1996 to 2001 were studied. The variables studied prior to their encoding for statistical treatment were: physical characteristics of x-ray unit, any anomalies in the way the equipment worked, film processing, and mean dose of radiation used to take an X-rays exploration of the upper second molar in each surgery or centre, taking into account legislation concerning radiological protection.

The degree of dependence and correlation between variables was assessed by an analysis of variance, complemented by a contrast of means using the minimum significant difference method ( $p < 0.05$ ). Quantitative means were compared by regression and lineal correlation analysis.

## RESULTS

The tube potentials ranged from 50 kVp to 70 kVp, setting increased toward the recommended 70 kVp during the five-year study. From 1996-97 only 61.67% of the equipment was used at 70 kVp, rising to 72.79% in 2001. This represents an 11,12% increase (figure 1). In 2001, the milliamperage used was 8 mA representing 79.8 % of the cases, an increase of 4.11% in the five years of the study. During the first year of the study filtration varied from 0 mm Al to 3.4 mm Al, although 98.97% of the equipment using more than 1.5 mm Al and in 2001.

In 1996, 88.02% of the equipments used PID of 20 cm, a figure which had risen to 90.11% in 2001. Nearly 9.92% of the x-ray machines surveyed from 1.996-7 showed variation in excess of 10% in kVp, 6.7 % did not displayed accuracy in exposure time and 9.4 % showed a variation in tube performance exceeding  $\pm 20\%$ . Other faults were less common: deviations in the reproducibility of the radiological dose (0.71%) and time (0.7%) and alterations in the alignment of the x-rays tube (3.94%). In 2001, There have been differences between the kVp (8.92%) and exposure time (14.24%) measured and the one mentioned by the manufacturer, also there have been 4.1% variations in tube efficiency and 3.34% in anomalies of alignment (figure 2). Acoustic-luminous signal had worked incorrectly in 1.11% of x-ray units during 2001. During the first year of the study, 14.05% of installations had a fixed exposure switches outside the room and 62.22% fulfilled the European recommendations of cords being no more than 2 metres in length, although some had cords extending less than a metre, remote controls and even fixed exposition switches in the operating room. Most clinics (87.31%) used manual processing during the first year, while 6.72% uses automatic means, 4.45% used digital techniques. In the last year of the study, the number of manual processing of film decreased to 81.27% due mainly to an increase use in digital systems (11.95%), while only 5.81% used automatic processing (figure 3). In 1996, 65.62% of the installations replaced the processing solutions on a weekly basis, 20.83% fortnightly and only 7 installations replaced the solutions it each time. Five years later, 80.61% replaced weekly, 5.81% fortnightly, and 4.94% monthly. In a few installations (0.9%) the solutions were replaced every 45 days and in two cases (0.12%) every three months. The number of clinics not strictly following the manufacturer's processing recommendations changed very little during the study period (80.13% in 1996 and 75.95% in 2001).

In type of film, 72.58% used D-Speed (Ultra-speed, Kodak®) in 1996, a figure that had risen to 79.19% in 2001. More sensitive film (E-speed, Ekta-speed, Kodak®) was used in 17.02% of installations in 1996, falling to 10.24% in subsequent years. In the last year of the study F-speed (Insight, Kodak®) a higher speed film, was used in 4.53% of the cases (Figure 4).

With regards to radiation dose used for an upper second molar, 92% fulfilled the EU recommendations in 1996-97 and did not exceed 7 mGy on average per exposure. The mean dose was 3.015 mGy. Five years later, 97.98% used doses below 7 mGy with a mean of 3.123 mGy, representing a drop of 18.75% per exposure (Figure 5).

## CONCLUSION

In conclusion, certain anomalies in some parameters (kVp, mA, film type, processing system, change of liquids and the use of circular collimator) are evident, which may increase the radiation dose to which patients are exposed. If these problems were tackled, the doses could well be reduced. Although EU recommendations concerning radiological protection in dental clinics are not met in all cases, the introduction of legislation has resulted in a gradual improvement in dental radiology practices.

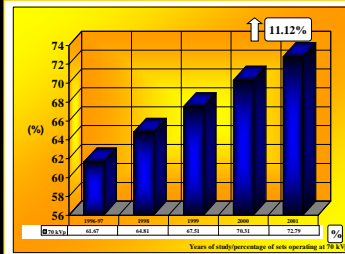


Figure 1: Evolution of dental x-ray sets operating at 70 kVp during the study (1996-2001).

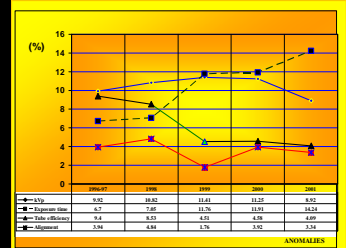


Figure 2: Evolution to anomalies in intraoral radiology equipment operation.

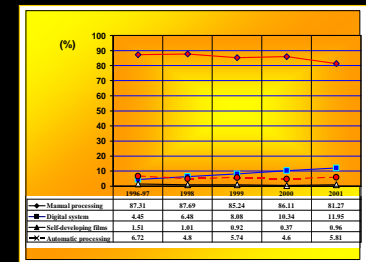


Figure 3: Type of film processing found in the study (1996-2001).

FIGURE 4: Type of intraoral radiographic film used during the study.

Type of film	1996-97	1998	1999	2000	2001
Ultra-speed	72.58%	80.38 %	79.05 %	80.77 %	79.19 %
Ekta-speed	17.02 %	15.31 %	15.37 %	13.25 %	10.24 %
Dentus M2	5.07 %	2.03 %	4.25 %	3.95 %	4.09 %
Insight	0 %	0 %	0 %	0.43 %	4.53 %
Other	5.33 %	2.28 %	1.33 %	2.03 %	1.95 %

Figure 4: Type of intraoral radiographic film used during the

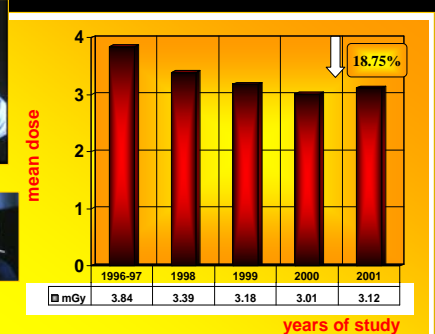
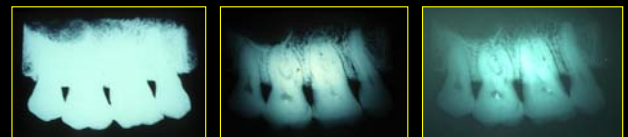


Figure 5: Evolution of radiation dose used in dental radiology (mGy).