

INFLUENCIA DE LA EDAD Y HABITO DE FUMAR SOBRE LAS FRECUENCIAS ESPONTANEA Y RADIOINDUCIDA DE MICRONUCLEOS EN LINFOCITOS HUMANOS

Di Giorgio, Marina - Nasazzi, Nora - Heredia, M.Laura
Ente Nacional Regulador Nuclear
ARGENTINA

RESUMEN:

El ensayo de micronúcleos (MN) en células binucleadas (CB) con bloqueo de la citocinesis en linfocitos humanos es un método relativamente rápido y de sencilla implementación utilizado para evaluar daño cromosómico radioinducido y por lo tanto, un dosímetro adecuado para la estimación de sobreexposiciones accidentales.

Con el objeto de definir más ampliamente el uso de este dosímetro, se analizó la influencia de los denominados "factores de confusión": edad, sexo y condiciones de estilo de vida (particularmente hábito de fumar) sobre las frecuencias espontánea y radioinducida de MN. El análisis de los datos por correlación múltiple y evaluación de las variables de a pares, mostró una influencia estadísticamente significativa de la edad y hábito de fumar sobre las frecuencias espontánea y radioinducida de MN. Este resultado sustenta la conveniencia de tomar en consideración los mencionados "factores de confusión" en las estimaciones dosimétricas de sobreexposiciones accidentales, particularmente para dosis inferiores a 2 Gy.

INTRODUCCION:

Desde 1976 en que Countryman y Heddle (1) comunicaron por primera vez la radioinducción de MN en linfocitos humanos, el test de MN ha sido ampliamente utilizado para detectar efectos clastogénicos (daño cromosómico) y efectos aneugénicos (efectos sobre el huso mitótico que resultan en una segregación cromosómica anormal durante la división celular) producidos por agentes químicos y físicos (radiación ionizante) (2), por lo cual ha sido considerado muy útil para la evaluación y monitoreo de exposiciones genotóxicas in vivo e in vitro (3).

El recuento de MN en CB con bloqueo de la citocinesis es un procedimiento relativamente rápido y de sencilla implementación que se utiliza como dosímetro biológico alternativo al citogenético convencional (frecuencia de dicéntricos) en

el estudio de daño cromosómico radioinducido, resultando particularmente útil en situaciones accidentales que involucren gran número de personas.

Los MN son cuerpos citoplasmáticos esféricos, detectados en interfase, más pequeños y morfológicamente idénticos al núcleo celular. Se originan a partir de fragmentos acéntricos o cromosomas enteros que quedan retrasados en la anafase y fallan en su incorporación a los núcleos hijos durante la mitosis. Estudios utilizando anticuerpos antikinetocono (4), muestran que los MN radioinducidos derivan predominantemente de fragmentos acéntricos.

Después de un evento inductor de MN (daño genotóxico) sólo aquellas células que se dividen pueden expresar su daño cromosómico como MN. La utilización de la técnica de MN con bloqueo de la citocinesis por el agregado de Citocalasina B (5) garantiza el recuento de MN en células que se dividen y que han completado su primer ciclo de división celular (2da. interfase), fácilmente reconocibles por su aspecto binucleado.

El reconocimiento, de cambios en el status citogenético debidos a la radiación, con fines de dosimetría biológica, requiere que los valores de frecuencia espontánea sean adecuadamente determinados. Datos de nuestro laboratorio indican una frecuencia media espontánea para un pool de donantes sanos de $0,013 \pm 0,008$ (6). Esta alta frecuencia espontánea muestra además una amplia variabilidad interindividual. Algunos autores sugieren que esta variabilidad es debida a factores tales como edad, sexo y condiciones de estilo de vida (hábito de fumar, consumo de alcohol, dieta, etc.) (7).

El objetivo del presente trabajo es analizar la influencia de la edad, sexo y hábito de fumar sobre las frecuencias espontánea y radioinducida de MN, a fin de definir más ampliamente la aplicación del dosímetro de MN en la estimación de sobreexposiciones accidentales.

MATERIALES Y METODOS:

La estimación de la frecuencia de MN fue analizada en cultivos de linfocitos de sangre periférica provenientes de 50 dadores sanos en el rango de 4 a 62 años, divididos en dos grupos sobre la base de su condición de fumador. Una fracción de la muestra fue irradiada in vitro con radiación gamma de Co-60 en el rango de 0.35 Gy - 4 Gy con un equipo PICKER C4M60 a una tasa de dosis media de 0.70 Gy / min.

Metodología de cultivo: Se incubaron 0.2 - 0.4 ml de sangre entera, extraída por venipunción, en 8ml. de medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 20% (v/v) durante 72 hs. a 37°C. Los linfocitos fueron estimulados a dividirse con fitohemaglutinina P (1 µg/ml, Difco). A las 44 hs. de cultivo se

agregó citocalasina B (4,5 µg/ml, Sigma). A las 72 hs. de incubación las células fueron colectadas por centrifugación y tratadas con solución hipotónica, según método de Iskandar (8), para lograr la preservación del citoplasma. La fijación se realizó con metanol / ácido acético (3:1) y se coloreó con Giemsa 5% (pH 6.8). Se estableció la frecuencia de MN evaluando de 500 a 2500 células binucleadas por muestra y por punto de dosis, aplicando los criterios de Countryman y Heddle (1976), Fenech (1993) (1, 7) para la identificación de micronúcleos y de células binucleadas.

Análisis estadístico:

Se realizó un análisis de regresión lineal a fin de evaluar la frecuencia espontánea de MN en función de la edad.

El ajuste de las curvas de calibración se efectuó aplicando un método de cuadrados mínimos repesado iterativo, donde el peso es la varianza.

Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para la evaluación de la frecuencia de MN espontánea y radioinducida (variable dependiente) respecto de la dosis, edad, sexo y hábito de fumar (variables independientes).

Todas las variables fueron consideradas dentro de la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4$$

donde:

Y = frecuencia de MN

β_0 = frecuencia espontánea.

β_1 , β_2 , β_3 y β_4 = parámetros estimados.

X_1 = dosis (0 Gy - 4 Gy)

X_2 = edad (4 - 62 años)

X_3 = sexo (0 : varón ; 1 : mujer)

X_4 = hábito de fumar (1 : fumador \geq 20 cigarrillos / día ; 0 : no fumador)

Los modelos de regresión múltiple son más apropiados cuando la variable dependiente (frecuencia de MN) es continua y sigue una distribución Normal, con varianza constante. Para eventos raros tales como la producción de MN, asumimos que la distribución es de Poisson por lo que las premisas de distribución Normal y varianza constante resultan inapropiadas.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se utilizó un modelo de regresión lineal múltiple sobre datos transformados, es decir, tomando el logaritmo natural de la frecuencia de MN a fin de normalizar la variable dependiente.

RESULTADOS:

La Tabla I muestra la base de datos, proveniente de 50 dadores sanos, en la que se consignan: número de células binucleadas (CB) evaluadas, número de MN, frecuencia de MN (MN/CB), logaritmo de la frecuencia de MN, hábito de fumar (fumador : 1 ; no fumador : 0), sexo (femenino : 1; masculino : 0), dosis (0 Gy - 4 Gy) y edad (4 - 62 años).

Por medio de un modelo de regresión lineal simple se analizó la influencia de la edad sobre la frecuencia de espontánea de MN, tomando los datos como pool (Fig. I) y diferenciando los donantes fumadores de los no fumadores (Fig. II y III). Los resultados provenientes de los 50 donantes analizados, sugieren una correlación significativamente positiva ($p < 0,0001$) de la frecuencia espontánea de MN con la edad.

El análisis de los datos evaluados por grupos etarios: donantes de 25 a 42 años y donantes de 42 a 62 años, sugiere que las diferencias en las frecuencias de MN observadas por grupos etarios son menores que las observadas por la condición de fumador y que la condición de fumador incrementa tres veces la frecuencia de MN respecto de la condición de no fumador, excluyendo a los donantes menores de 25 años de este análisis. Estos resultados justifican una evaluación de la condición de fumador y no fumador. Para ello se realizó una curva de calibración in vitro para donantes fumadores y otra para donantes no fumadores. Los parámetros de la relación dosis-respuesta fueron obtenidos ajustando los datos de cada donante separadamente. El ajuste respondió a un modelo lineal cuadrático según la ecuación:

$$y = c + \alpha D + \beta D^2, \text{ siendo}$$

y = frecuencia de MN para la dosis evaluada

D = dosis expresada en Gy

a) para donantes no fumadores:

$$c = 1,14 \cdot 10^{-2} \pm 0,10 \cdot 10^{-2}$$

$$\alpha = (2,29 \cdot 10^{-2} \pm 0,49 \cdot 10^{-2}) \text{ 1/Gy}$$

$$\beta = (3,08 \cdot 10^{-2} \pm 0,19 \cdot 10^{-2}) \text{ 1/Gy}^2$$

$$\chi^2 = 53,3 \quad \text{GL} = 24$$

b) para donantes fumadores:

$$c = 2,32 \cdot 10^{-2} \pm 0,13 \cdot 10^{-2}$$

$$\alpha = (3,33 \cdot 10^{-2} \pm 0,53 \cdot 10^{-2}) \text{ 1/Gy}$$

$$\beta = (2,28 \cdot 10^{-2} \pm 0,30 \cdot 10^{-2}) \text{ 1/Gy}^2$$

$$\chi^2 = 57,22 \quad \text{GL} = 27$$

De una comparación preliminar de ambas curvas de calibración surge la necesidad de ampliar la muestra para dosis en el rango de 0Gy - 2Gy a fin de

evaluar la significación de la diferencia observada entre ambas curvas, siendo el punto de 2Gy el correspondiente a la intersección de las mismas.

La influencia de la edad, sexo y hábito de fumar sobre las frecuencias espontánea y radioinducida de MN se determinó mediante un análisis de regresión lineal múltiple. Se observó una correlación significativamente positiva de la frecuencia espontánea de MN (variable dependiente) con la edad y hábito de fumar (variables independientes) ($R^2 = 0.59$) como así también de la frecuencia de MN radioinducidos con la dosis, edad y hábito de fumar ($R^2 = 0.86$).

Con respecto al sexo, el análisis de los resultados indica que éste no influencia significativamente la variabilidad de la frecuencia de MN, pero se observa una mayor dispersión en los resultados para mujeres respecto a la observada en varones.

DISCUSION:

El análisis global de los resultados indica que los denominados “factores de confusión”: edad y hábito de fumar tienen una influencia estadísticamente significativa sobre las frecuencias espontánea y radioinducida de MN. Estos resultados sustentan la conveniencia de tomar en consideración los mencionados factores en las estimaciones dosimétricas de sobreexposiciones accidentales particularmente para dosis inferiores a 2Gy.

Si bien el sexo no influencia significativamente la variabilidad de la frecuencia de MN, la mayor dispersión en las frecuencias de MN observada en mujeres respecto a la de varones puede ser debida a la pérdida no disyuncional de cromosomas X.

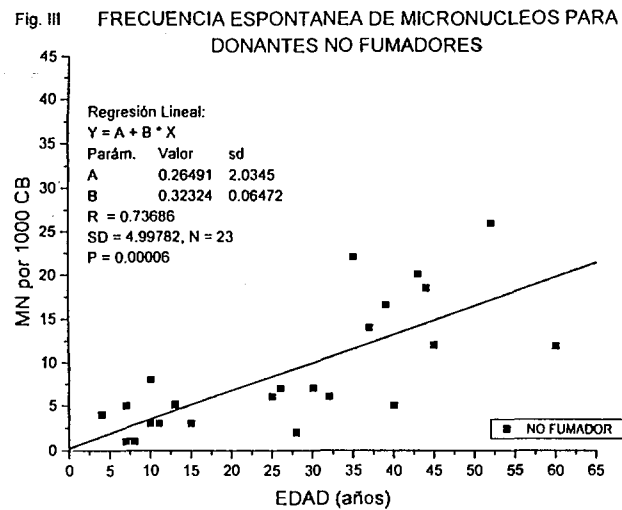
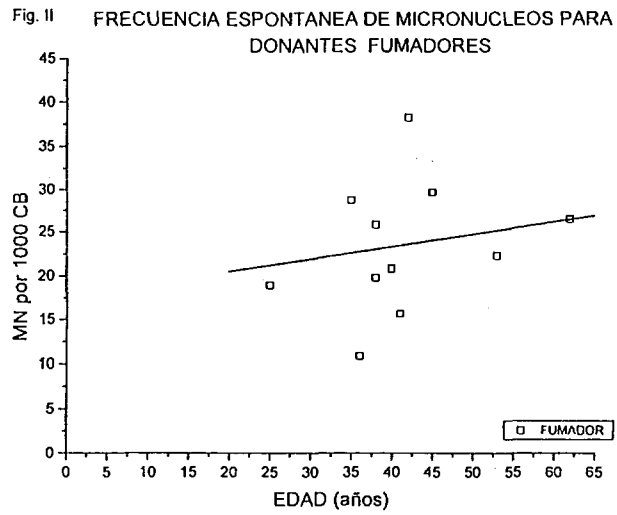
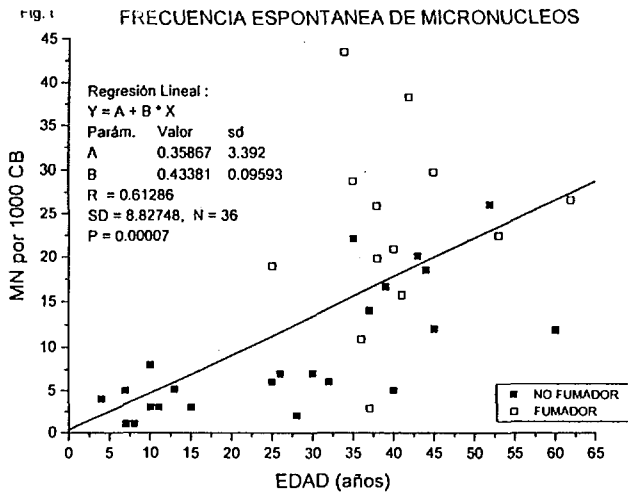
La comparación de las curvas de calibración fumador-no fumador sugiere la necesidad de ampliar la muestra para el estudio de la significación de las diferencias observadas entre ambas curvas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el financiamiento parcial provisto por un contrato de asistencia con la International Atomic Energy Agency (Research Contract N° 8369 / RB)

Tabla I

CB	MN	FRECUENCIA	LN(FREC)	FUM=1/NFUM=0	FEM=1/MASC=0	DOSIS (Gy)	EDAD
1000	4	0.0040	-5.5215	0	1	0	4
1000	5	0.0050	-5.2983	0	1	0	7
1000	1	0.0010	-6.9078	0	0	0	7
1000	1	0.0010	-6.9078	0	1	0	8
1001	8	0.0080	-4.8293	0	0	0	10
1000	3	0.0030	-5.8091	0	1	0	10
1000	3	0.0030	-5.8091	0	0	0	11
1166	6	0.0051	-5.2696	0	0	0	13
1000	3	0.0030	-5.8091	0	1	0	15
500	3	0.0060	-5.1160	0	0	0	25
1007	7	0.0070	-4.9688	0	0	0	26
500	1	0.0020	-6.2146	0	0	0	28
1000	7	0.0070	-4.9618	0	0	0	30
500	3	0.0060	-5.1160	0	1	0	32
500	11	0.0220	-3.8167	0	0	0	35
500	7	0.0140	-4.2687	0	0	0	37
846	14	0.0165	-4.1015	0	1	0	39
1000	5	0.0050	-5.2983	0	0	0	40
500	10	0.0200	-3.9120	0	0	0	43
434	8	0.0184	-3.9936	0	0	0	44
500	6	0.0120	-4.4228	0	1	0	45
502	13	0.0259	-3.6537	0	0	0	52
1012	12	0.0119	-4.4348	0	0	0	60
1092	28	0.0256	-3.6636	0	1	0.35	35
1146	35	0.0305	-3.4887	0	1	0.35	35
1021	30	0.0294	-3.5273	0	1	0.5	32
1747	45	0.0258	-3.6590	0	0	0.5	33
1134	49	0.0432	-3.1417	0	1	0.5	35
606	21	0.0347	-3.3624	0	1	0.5	60
577	34	0.0589	-2.8315	0	1	1	32
1028	60	0.0584	-2.8410	0	0	1	33
1004	179	0.1783	-1.7244	0	1	2	32
1692	304	0.1797	-1.7166	0	0	2	33
1279	282	0.2205	-1.5119	0	1	2	40
501	157	0.3134	-1.1604	0	1	3	32
1247	429	0.3440	-1.0670	0	0	3	33
501	308	0.6148	-0.4865	0	1	4	32
826	487	0.5896	-0.5283	0	0	4	33
2110	40	0.0190	-3.9656	1	1	0	25
1380	60	0.0435	-3.1355	1	0	0	34
941	27	0.0287	-3.5511	1	1	0	35
641	7	0.0109	-4.5171	1	0	0	36
1035	3	0.0029	-5.8435	1	0	0	37
465	12	0.0258	-3.6571	1	0	0	38
607	12	0.0198	-3.9236	1	1	0	38
1920	40	0.0208	-3.8712	1	0	0	40
510	8	0.0157	-4.1550	1	1	0	41
1099	42	0.0382	-3.2645	1	1	0	42
1955	58	0.0297	-3.5177	1	1	0	45
1120	25	0.0223	-3.8022	1	1	0	53
984	26	0.0264	-3.6335	1	1	0	62
1113	46	0.0413	-3.1862	1	1	0.5	25
377	14	0.0371	-3.2932	1	0	0.5	28
596	18	0.0302	-3.4999	0	1	0.5	35
979	31	0.0317	-3.4525	1	1	0.5	35
590	26	0.0441	-3.1220	1	0	0.5	36
1155	29	0.0251	-3.6846	1	0	0.5	37
724	26	0.0359	-3.3267	1	0	0.5	38
455	17	0.0374	-3.2871	1	1	0.5	41
1643	67	0.0408	-3.1996	1	1	0.5	45
2267	75	0.0331	-3.4087	1	0	0.5	53
2387	108	0.0452	-3.0957	1	1	1	25
1000	101	0.1010	-2.2926	1	0	1	34
2393	212	0.0886	-2.4237	1	0	1	34
1002	80	0.0798	-2.5277	1	1	1	34
1000	90	0.0900	-2.4079	1	0	1	35
2522	213	0.0845	-2.4715	1	1	1	35
907	141	0.1555	-1.8614	1	1	2	25
1139	196	0.1721	-1.7598	1	0	2	34
830	140	0.1687	-1.7798	1	1	2	35
507	95	0.1874	-1.6746	1	0	2	36
698	154	0.2206	-1.5113	1	0	2	38
652	111	0.1702	-1.7705	1	1	2	41
355	60	0.1690	-1.7778	1	1	2	45
486	160	0.3292	-1.1110	1	1	3	25



REFERENCIAS

- 1) Countryman, P.I. and Heddle J.A. (1976) *The Production of Micronuclei from Chromosome Aberrations in Irradiated Cultures of Human Lymphocytes*, *Mutat. Res.*, 41, 321-332.
- 2) Tates, A.D., Van Welie, M.T. and Ploem, J.S. (1990) *The Present State of the Automated Micronucleus Test for Lymphocytes*, *Int. J. Radiat. Biol.*, 58, 813-825.
- 3) Fenech, M. (1991) *Optimization of Micronucleus Assays for Biological Dosimetry*, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 372, 317-320.
- 4) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989) *Identification of Aneuploidy Inducing Agents Using Cytokinesis-Blocked Human Lymphocytes and Antikinetochores Antibody*, *Environ. Mol. Mutagen*, 13, 34-43.
- 5) Fenech, M. and Morley, A. (1985) *Measurement of Micronuclei in Lymphocytes*, *Mutat. Res.*, 147, 29-36.
- 6) Di Giorgio, M. and Thomasz, E. (1992) *Use of Micronuclei in Biological Dosimetry. A Method for Rapid Screening in the Case of Large Scale Radiation Accidents*. *Proceed. IRPA-8, Canada / Seg. Radiológica*, 7, 34-41.
- 7) Fenech, M. (1993) *The Cytokinesis-Block Micronucleus Technique: A Detailed Description of the Method and its Application to Genotoxicity Studies in Human Populations*, *Mutat. Res.*, 285, 35-44.
- 8) Iskandar, O. (1979) *An Improved Method for the Detection of Micronuclei in Human Lymphocytes*, *Stain Technol.*, 54, 221.

SUMMARY:

Several endpoints have been used for monitoring human populations for environmental or occupational exposure to genotoxic agents, particularly ionizing radiation. The cytokinesis-block micronucleus (MN) assay in peripheral lymphocytes is a reliable method for assessing radiation induced chromosomal damage (DNA breaks and mitotic spindle disturbances) and thus, a suitable dosimeter for estimating in vivo whole body exposures.

To further define the use of this assay in Biological Dosimetry, a study to determine the influence of age, sex and life style factors (smoking habit) on the spontaneous and radiation induced MN frequencies was performed.

The estimation of MN frequencies was analyzed in lymphocytes cultures from 50 healthy donors aged between 4 and 60 years. On the basis of their smoking habit they were divided into 2 groups. A fraction of the sample was irradiated in vitro with γ rays in the range of 0.35 Gy to 4 Gy.

A statistically significant influence on the spontaneous MN frequency was observed ($R^2 = 0.59$) when the variables age and smoking habit were analyzed and also a statistically significant influence on the radiation induced MN frequency was obtained ($R^2 = 0.86$) when dose, age and smoking habit were studied. Sex did not influence MN variability significantly but there was a greater dispersion in the results for females when compared to males, possibly due to the loss of X chromosomes. The comparison of the data from smoking donors to non smoking donors supports the convenience of taking into account the smoking habit for estimating in vivo whole body exposure to γ rays for doses below 2 Gy.