



Micronúcleos: sensibilidad para la detección de daño radioinducido

Di Giorgio, M.; Nasazzi, N.B. y Taja, M.R.

30 - 05

ARN
autoridad regulatoria nuclear

l

Micronúcleos: sensibilidad para la detección de daño radioinducido

Di Giorgio, M.; Nasazzi, N.B. y Taja, M.R.

MICRONÚCLEOS: SENSIBILIDAD PARA LA DETECCIÓN DE DAÑO RADIOINDUCIDO¹

Di Giorgio, M., Nasazzi, N.B. y Taja, M.R.

Autoridad Regulatoria Nuclear
Argentina

RESUMEN

A fin de utilizar el ensayo de micronúcleos (MN) con bloqueo de la citocinecis como dosímetro biológico es necesario contar con curvas de calibración para diferentes calidades de radiación y evaluar los factores que inciden sobre la sensibilidad del método, principalmente a bajas dosis de radiación de baja transferencia lineal de energía.

En el presente trabajo se presentan curvas dosis-respuesta, utilizando radiación γ de cobalto 60, para donantes fumadores y no fumadores, evaluados separadamente en el rango de 0Gy a 2Gy y la correspondiente curva de calibración pool (fumadores + no fumadores) en el rango de 0Gy a 4Gy. Concluimos que para las evaluaciones dosimétricas de sobreexposiciones accidentales parece apropiado utilizar la curva de calibración pool y en los casos de determinaciones dosimétricas hasta 0,5Gy es conveniente utilizar el correspondiente término espontáneo en la curva de calibración, dependiendo del hábito de fumar del individuo a evaluar.

Resultados previos de nuestro laboratorio y la revisión del estado actual de la técnica de MN permiten:

I) Disponer de distintas relaciones dosis-respuesta para rayos x, radiación γ y neutrones, observándose que la forma general de las curvas es similar en casi todos los laboratorios, si bien se obtienen marcadas diferencias en la relación cuantitativa. Esto impone la necesidad de que cada laboratorio cuente con curvas de calibración propias.

II) Observar para radiación de baja transferencia lineal de energía:

una alta y variable frecuencia espontánea que impide una adecuada estimación de la dosis por debajo de 0,2Gy a 0,3Gy.

una menor sensibilidad de la técnica de MN respecto de la convencional de dicéntricos, a altas dosis

una distribución sobredispersa de los MN radioinducidos respecto de la distribución de Poisson, lo que aumenta las incertezas en la estimación dosimétrica.

una correlación estadísticamente significativa de las frecuencias espontánea y radioinducida de MN con la edad y el hábito de fumar, siendo el hábito de fumar el factor de mayor influencia.

un aumento de la sensibilidad del ensayo en el rango de las bajas dosis utilizando sondas pancentroméricas, teniendo en cuenta el origen de los MN radioinducidos

¹ Este trabajo ha sido presentado al 4^o Congreso Regional en Seguridad Radiológica y Nuclear a celebrarse en La Habana, Cuba, entre el 19 y 23 de octubre de 1998.

INTRODUCCIÓN

El ensayo de micronúcleos (MN) en linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis ha sido ampliamente utilizado para la evaluación de daño cromosómico inducido por radiaciones ionizantes y clastógenos químicos, y considerado un dosímetro biológico potencialmente útil en accidentes que involucren gran número de personas (1). Para utilizar el test de MN con fines de Dosimetría Biológica, es esencial tener un adecuado conocimiento de la frecuencia espontánea de MN, contar con curvas dosis-respuesta para diferentes calidades de radiación, evaluar el límite de detección, saturación y los principales factores que inciden sobre la sensibilidad de la técnica.

Una de las mayores desventajas del ensayo de MN es su reducida sensibilidad para la detección de daño inducido por bajas dosis de radiación de baja transferencia lineal de energía, debido a su alta frecuencia espontánea que muestra además una amplia variabilidad interindividual. Se sugiere que diversos factores denominados "de confusión", tales como el hábito de fumar, la edad y el sexo contribuyen a la variabilidad observada. Datos de nuestro laboratorio indican una correlación significativamente positiva de las frecuencias espontánea y radioinducida de MN con la edad y el hábito de fumar, siendo el hábito de fumar el factor de confusión de mayor influencia. Estas conclusiones parecieron justificar el estudio de las relaciones dosis-respuesta para donantes fumadores y no fumadores separadamente, utilizando radiación γ de cobalto 60.

Teniendo en cuenta las consideraciones previamente mencionadas, los objetivos del presente trabajo son: I) Aumentar el número de datos de las relaciones dosis-respuesta para donantes fumadores y no fumadores evaluados separadamente, respecto de datos previos del laboratorio (2), utilizando radiación γ de cobalto 60 en el rango de 0Gy a 2Gy; a fin de considerar si es aplicable alguna corrección a la curva de calibración que tenga en cuenta la condición de fumador del individuo a evaluar dosimétricamente, particularmente en el rango de las bajas dosis. II) Establecer conclusiones generales sobre el estado actual de la técnica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología de cultivo: Se incubaron 0,2 - 0,4 ml de sangre entera, extraída por venopunción, en 8 ml de medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 20% (v/v) a 37°C durante 72 horas. Los linfocitos fueron estimulados a dividirse con fitohemaglutinina P (1 μ g/ml, DIFCO). A las 44 horas de cultivo se agregó citocalasina B (4,5 μ g/ml, SIGMA) a fin de bloquear la citocinesis. A las 72 horas de incubación las células fueron colectadas por centrifugación y tratadas con solución hipotónica, según método de Iskandar (3), para lograr la preservación del citoplasma. La fijación se realizó con metanol/acético (3:1) y se coloreó con Giemsa al 5% (ph 6,8).

Se estableció la frecuencia de MN evaluando 500 a 2500 células binucleadas por muestra, aplicando los criterios de Fenech(1993) para la identificación de micronúcleos y de células binucleadas (4).

Las muestras fueron irradiadas con radiación γ de cobalto 60 en el rango de 0Gy a 2Gy con un equipo PICKER C4 M60 a una tasa de dosis media de 0,40Gy/min.

Análisis estadístico: El ajuste de las curvas de calibración para donantes fumadores y no fumadores se efectuó aplicando un método de cuadrados mínimos repesado iterativo, donde el peso es la varianza.

El análisis de la distribución de MN en células binucleadas fue testeado para su conformidad con la distribución de Poisson utilizando el "test u" de Papworth (5) y la relación varianza/media. Los errores de los coeficientes de las curvas de calibración y el error standard de las frecuencias observadas, fueron corregidos teniendo en cuenta la sobredispersión de la distribución.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Las curvas de calibración para donantes fumadores y no fumadores fueron aumentadas, respecto de las obtenidas previamente en nuestro laboratorio, con 20 nuevos datos en el rango de 0Gy a 2Gy, constituyendo una base de datos total conformada por 100 muestras analizadas.

El ajuste de ambas curvas resultó en un modelo lineal cuadrático. Dicho ajuste fue realizado hasta el punto de 2Gy promediando los datos para cada dosis.

$$y = c + \alpha D + \beta D^2$$

donde:

y = frecuencia de MN para la dosis evaluada
D = dosis en Gy

Los parámetros de cada curva de calibración fueron:

a) fumadores:

$$\begin{aligned} c &= 2,31 \times 10^{-2} \pm 0,25 \times 10^{-2} \\ \alpha &= (2,07 \times 10^{-2} \pm 1,27 \times 10^{-2}) \text{ Gy}^{-1} \\ \beta &= (2,89 \times 10^{-2} \pm 0,86 \times 10^{-2}) \text{ Gy}^{-2} \\ \chi^2 &= 7,83 \quad \text{GL} = 1 \end{aligned}$$

b) no fumadores:

$$\begin{aligned} c &= 1,25 \times 10^{-2} \pm 0,084 \times 10^{-2} \\ \alpha &= (3,02 \times 10^{-2} \pm 0,75 \times 10^{-2}) \text{ Gy}^{-1} \\ \beta &= (2,92 \times 10^{-2} \pm 0,50 \times 10^{-2}) \text{ Gy}^{-2} \\ \chi^2 &= 4,70 \quad \text{GL} = 2 \end{aligned}$$

El análisis de la distribución de MN en linfocitos binucleados resultó ser sobredisperso respecto a la distribución de Poisson, siendo la relación varianza/media promedio 1,13 para la curva de no fumadores y 1,17 para la de fumadores.

Aunque se observó una mayor dispersión de las frecuencias para los donantes fumadores respecto de los no fumadores, cada curva de calibración cayó dentro de las curvas del 95% de confianza de la otra, con excepción de los valores de frecuencia espontánea de ambas curvas de calibración. De modo que, para las estimaciones dosimétricas de sobreexposiciones accidentales parecería apropiado utilizar una curva de calibración pool (fumadores + no fumadores) y en los casos de determinaciones dosimétricas hasta 0,5Gy es conveniente utilizar el correspondiente término espontáneo en la curva de calibración, asociado a la condición de fumador del individuo evaluado.

Los parámetros de la curva de calibración pool fueron:

$$\begin{aligned} c &= 1,73 \times 10^{-2} \pm 0,05 \times 10^{-2} \\ \alpha &= (2,72 \times 10^{-2} \pm 0,27 \times 10^{-2}) \text{ Gy}^{-1} \\ \beta &= (2,81 \times 10^{-2} \pm 0,14 \times 10^{-2}) \text{ Gy}^{-2} \\ \chi^2 &= 9,59 \quad \text{GL} = 5 \end{aligned}$$

CONCLUSIONES GENERALES

- La forma general de las curvas dosis-respuesta es similar en casi todos los laboratorios si bien se observan marcadas diferencias en la relación cuantitativa. Esto impone la necesidad de que cada laboratorio posea sus propias curvas de calibración de frecuencia de MN. Una importante razón para esta variabilidad entre laboratorios es la diferencia en las condiciones experimentales (6).

Para radiación de baja transferencia lineal de energía:

- Datos de nuestro laboratorio indican una frecuencia media espontánea de MN en células binucleadas para un pool de donantes sanos de $0,013 \pm 0,008$ (7). Esta alta y variable frecuencia espontánea impide una adecuada estimación de la dosis por debajo de 0,2Gy a 0,3Gy.
- Se observa un término cuadrático pequeño en la relación dosis-frecuencia de MN. La contribución de este componente es tan pequeña que en particular si la curva de calibración fue ajustada hasta 3Gy ó 4Gy, un ajuste lineal es también compatible con la estadística. Este término cuadrático resulta ser menor que el de la curva de calibración de dicéntricos (técnica convencional) lo que determina una menor sensibilidad de la técnica de MN respecto de la convencional, a altas dosis. Esto se debe a que para una curva con un pronunciado término cuadrático, como es el caso de la de dicéntricos, el coeficiente de variación en la dosis es menor que el que se observa en las frecuencias, mientras que para la curva de micronúcleos los coeficientes de variación no son muy diferentes.
- Los MN radioinducidos tienden a presentar una distribución sobredispersa respecto de la distribución de Poisson. Esta sobredispersión aumenta el error standard de las frecuencias observadas de MN y por lo tanto las incertezas en la estimación dosimétrica.
- Origen de los MN: Estudios que incluyen medición del tamaño de MN (8), medición del contenido de DNA (9), tinción inmunofluorescente con anticuerpos antikinetocoro CREST (10) y más recientemente hibridación in situ por fluorescencia (FISH) con sondas de DNA que se unen específicamente a regiones centroméricas de los cromosomas (11) fueron utilizados para discriminar entre MN provenientes de fragmentos acéntricos y cromosomas enteros. Se observó que la mayor parte de los MN radioinducidos se origina primariamente a partir de fragmentos acéntricos, lo que denota la acción fundamentalmente clastogénica de las radiaciones ionizantes y que un menor número proviene de cromosomas enteros retrasados durante la anafase debido a algún defecto a nivel de huso mitótico o proteínas de kinetocoro. Los MN espontáneos están constituidos principalmente por cromosomas enteros. De modo que, la sensibilidad del ensayo de MN, en el rango de las bajas dosis, puede ser aumentada utilizando sondas pancentroméricas y efectuando el recuento de sólo aquellos MN centrómero negativos.
- Se ha estudiado la influencia de diversos posibles factores de confusión en el ensayo de MN tales como edad, sexo, hábito de fumar, consumo de alcohol, etc. Estos factores deben ser tenidos en cuenta en la utilización de este ensayo con fines de Dosimetría Biológica, particularmente en el rango de las bajas dosis. Muchos autores observan que la frecuencia espontánea de micronúcleos aumenta con la edad pero es menos clara su influencia sobre las frecuencias radioinducidas (12). Algunos trabajos muestran que cuando se analizan grandes grupos, pueden detectarse frecuencias espontáneas de MN levemente mayores en mujeres respecto de varones (12). También existe una gran controversia en cuanto a la influencia del hábito de fumar, aceptándose una tendencia al aumento de las frecuencias espontáneas en individuos fumadores respecto de no fumadores, no estableciéndose en qué medida el número de MN radioinducidos puede ser afectado (6).

En nuestro laboratorio hemos estudiado la influencia de la edad, sexo y hábito de fumar sobre las frecuencias espontáneas y radioinducidas de MN utilizando dos metodologías: un modelo de regresión lineal múltiple y un modelo de regresión de Poisson. Utilizando ambos modelos los resultados fueron concordantes. Se observó una correlación significativamente positiva ($R^2 = 0,59$) de la fre-

cuencia espontánea de MN con la edad ($t = 5,0$; $P < 0,0001$) y el hábito de fumar ($t = 3,15$; $P < 0,004$) y también, una correlación significativamente positiva ($R^2 = 0,96$) de la frecuencia total de MN (espontáneos + radioinducidos) con la edad ($t = 2,43$; $P < 0,02$) y el hábito de fumar ($t = 3,63$; $P < 0,0001$), siendo el hábito de fumar el factor de confusión de mayor influencia.

Nuestro estudio muestra que el sexo no tiene influencia estadísticamente significativa sobre las frecuencias espontánea y radioinducida de MN, aunque se observa una mayor dispersión de los datos en mujeres. La influencia de la edad sobre las frecuencias espontáneas de MN fue también analizada aplicando un modelo de regresión lineal a los datos, observándose:

$$y = 0,004 X + 0,0013 \text{ (y: frecuencia de MN; X: edad)}$$

$$R^2 = 0,32 \text{ para } N = 54$$

El estudio de las relaciones dosis-respuesta para donantes fumadores y no fumadores evaluados separadamente, mostró que cada curva de calibración cae dentro de las curvas del 95% de confianza de la otra, con excepción de los valores de frecuencia espontánea de ambas curvas de calibración. Por lo cual, para las evaluaciones dosimétricas por encima de 0,5Gy consideramos apropiado la utilización de una curva pool (fumadores + no fumadores) mientras que por debajo de dicha dosis es conveniente utilizar el correspondiente término espontáneo de la curva de calibración, asociado al hábito de fumar del individuo a evaluar.

REFERENCIAS

- 1- Fenech, M., 1991, Optimisation of Micronucleus Assays for Biological Dosimetry. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **372**, 373-386. Review.
- 2- Di Giorgio, M.; Nasazzi, N., 1994-95 / 1997-98, Informes Finales, OIEA Contrato de Investigación N° 302-J1-ARG 8369.
- 3- Iskandar, O., 1979, An improved Method for the Detection of Micronucleus in Human Lymphocytes. *Stain Technol.*, **54**, 221-223.
- 4- 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.
- 5- Savage, J., 1970, Sites of Radiation Induced Chromosome Exchanges. Appendix: Testing and Fitting Frequency Distributions, *Curr. Top. Radiat. Res.*, **6**, 131-194.
- 6- Müller, W-U.; Streffer, C., 1994, Micronucleus assays. *Adv. Mutag. Res.*, **5**, 1-133.
- 7- Di Giorgio, M.; Ferraro, M.; Thomasz, E., 1992, Use of Micronuclei in Biological Dosimetry. A Method for Rapid Screening in the Case of Large Scale Radiation Accidents, *Memorias IRPA-8, II*, 1734-1737. Montreal - Canadá.
- 8- Högstedt, B.; Karlsson, A., 1985, The Size of Micronuclei in Human Lymphocytes Varies According to Inducing Agent Used. *Mutat. Res.*, **156**, 229-232.
- 9- Pincu, M.; Callisen, H.; Norman, A., 1985, DNA Content of Micronuclei in Human Lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **47**, 423-432.
- 10- Degrassi, F.; Tanzarella, C., 1988, Inmunofluorescent Staining of Kinetochores in Micronuclei: a New Assay for the Detection of Aneuploidy. *Mutat. Res.*, **203**, 339-345.
- 11- Vral, A.; Thierens, H.; De Ridder, L., 1997, In vitro Micronucleus-Centromere Assay to Detect Radiation-Damage Induced by Low Doses in Human Lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, **71**, 61-68.
- 12- Müller, W.U.; Streffer, C.; Wuttke, K., 1995, Micronucleus Determination as Means to Assess Radiation Exposure. *Stem Cells*, **13 (Supl. 1)**, 199-206.



AUTORIDAD REGULADORA NUCLEAR
REPÚBLICA ARGENTINA