

DOSIMETRÍA BIOLÓGICA BASADA EN LA DETECCIÓN DE MICRONUCLEOS EN PACIENTES EXPUESTOS A COBALTOTERAPIA EN PARAGUAY¹.

F.J. Gómez Grance², V. Fernandez², G. Guggiari³, T. Resquin⁴, F. Cabañas Duarte², A. Gómez⁵, J. Alfonso⁵.

¹Publicación Financiada por FaCEN y MSP y BS –Instituto Nacional del Cáncer, ^{2,5}Facultad de Ciencias Exactas y Naturales –UNA, ^{3,4} Instituto Nacional del Cáncer – MSP y BS.

RESUMEN: Las radiaciones ionizantes son genotóxicas y pueden ser cancerígenas si las dosis de radiación son superiores a los valores dictados por normas nacionales e internacionales. Los efectos genotóxicos son estudiados mediante bioensayos de Micronúcleos (MN) en células de la mucosa bucal de pacientes con cáncer del Instituto Nacional de Cáncer de Aregua, los cuales, dentro del esquema de tratamiento son expuestos a radiaciones ionizantes. El objetivo del presente trabajo es el de evaluar el nivel de genotoxicidad en diferentes modalidades de exposición al tratamiento radioterapéutico y relacionarlo con las dosis de radiación. Los resultados de los análisis presentaron una amplia variabilidad en el conteo de Micronúcleos, debido a factores Físicos y Biológicos, como las diversas dosis de radiación para el tratamiento de diversos tumores en diferentes órganos. Como conclusión se observa que cuanto mas lejana es la zona de irradiación a la toma de la muestra (la mucosa bucal) hay una disminución en la aparición de MN, este hecho puede llevar a la estimación de las dosis de radiación absorbida por el paciente y la determinación de niveles de formación de MN, como un indicador biológico de buena práctica. También se ha identificado una diferencia sustancial entre la frecuencia de micronúcleos y el alto porcentaje de células apoptoticas a partir del octavo día de tratamiento, en algunos pacientes.

Palabras claves: Dosimetría, Genotóxicos, Micronúcleos, Radiación ionizante.

ABSTRACT: Ionizing radiations are genotoxic and might be carcinogenic if the radiation doses are above the values dictated by national and international standards. The genotoxic effects are studied by means of bioassays of micronuclei (MN) in cells of the patients' mucous mouths of the National Institute of Cancer in a city named Aregua, whom were exposed to ionizing radiations within their treatment scheme. The objective of the present work is to evaluate the genotoxic level at different modalities of exposure to the radio-therapeutic treatment and to relate them to the radiation doses. The analysis results displayed an ample variability in the count of MN, due to Physical and Biological factors, as the diverse radiation doses for the treatment of diverse tumors in different organs. In conclusion, it was observed that the most distant it is the zone of irradiation to the taking of the sample (the mouths' mucous) the least MN appearance. This means that the levels of MN can be used to estimate the radiation doses absorbed by the patient and as well as a biological indicator of good practice. Also, it has been identified a substantial difference between the frequency of micronucleus and the high percentage of apoptotic cells as on the eighth day of treatment, in few patients.

Key words: Dosimetría, Genotóxicos, Micronúcleos, Radiación ionizante.

INTRODUCCIÓN

La carcinogénesis esta determinada por varios factores, tanto genéticos como ambientales, por tal razón los factores que involucran la cura del cáncer también está limitada por estos y otros factores de carácter socio cultural. (Jianlin et al, 2004)

Debido a lo anterior haremos referencia a los fundamentos de carácter radiobiológico de la on-

cología actual para el tratamiento de un tumor maligno. En ese sentido la Oncología Radiante con mas de cincuenta años de experiencia y constante evolución, tanto en el seguimiento médico como en el tratamiento con mejores calidades de haces de radiación, ha mejorado la calidad de vida de los pacientes, aumentando la tasa de sobrevivida en forma paulatina en el transcurrir del tiempo. (Galle y Paulli,

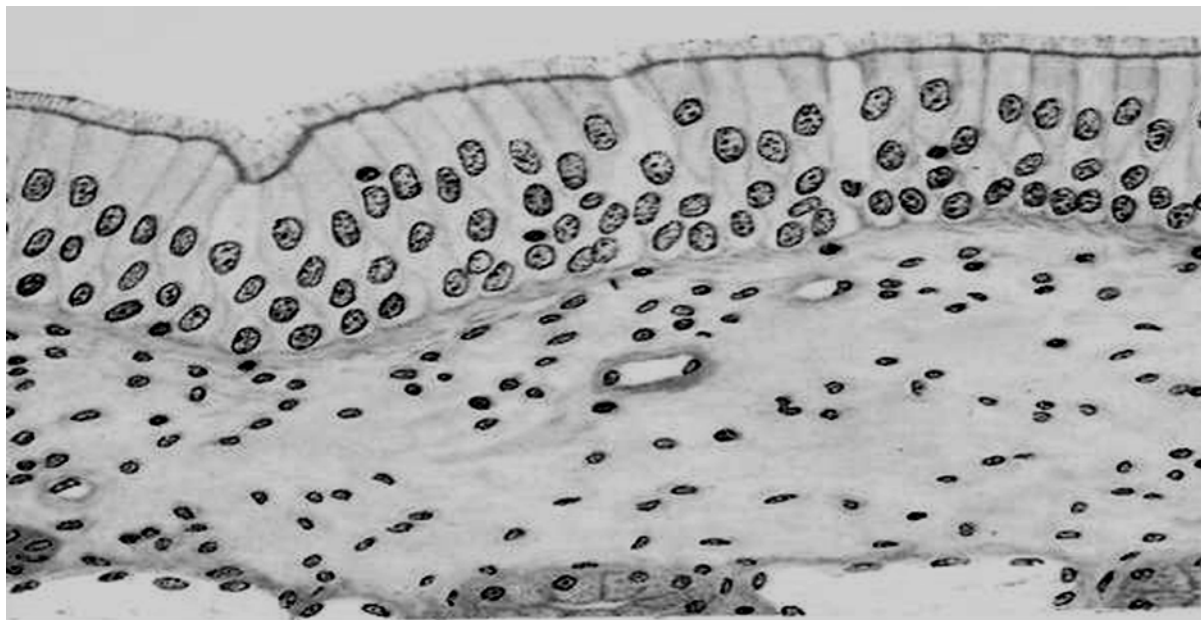


Figura 1. Células del epitelio y la región basal de la mucosa bucal, 330X. (Di Fiore, 1975)

2003)

Es conocido el inicio de la carcinogénesis como la incapacidad de la formación estructural del cromosoma, a causa de la falta de reparación de la cadena ADN dañada por los procesos de formación de radicales libres o por daño directo de agentes físicos o químicos. En este sentido las radiaciones ionizantes como agente Físico, interactúan con el medio acuoso en el cual se encuentra la cadena de ADN, formando en la vecindad de la misma, radicales libres que dañan la estructura del ADN, a demás de formar radicales libres, estas radiaciones son capaces de romper la cadena de ADN mediante una ionización de las bases que las conforma. La primera de las interacciones se denomina interacción indirecta y la segunda interacción directa. (International Atomic Energy Agency, 1986; Jianlin et al., 2007)

Los dos tipos de interacciones están presentes en una irradiación de pacientes oncológicos con técnica de radioterapia, sean con modalidades de Braquiterapia o Teleterapia, sin embargo la proporción de cada interacción es diferente en regiones anatómicas diferentes, dependiendo a demás de estadio del tumor.

En el presente estudio se utilizó un equipamiento específico de Teleterapia, siendo este un equipo con una fuente de Co -60, emisor de rayos gamma de 1,25 MeV, con el cual se tratan una amplia gama de enfermedades oncológicas en el Instituto Nacional del Cáncer-Paraguay.

Los rayos gamma emitidos por la fuente de Co-60, son colimados y direccionados al volumen tumoral en el paciente, una vez que llegan a éste, interactúan con el medio biológico produciendo una serie de reacciones físico-químicas como ser variabilidad de pH., creación de radicales libres y ruptura de cromosomas, estos efectos a nivel celular originan células con distintos daños cromosómicos, como ser los llamados huevo-quebrado (cross-egg) y micro-núcleo, que inducen a apoptosis.

Los micro-núcleos son fragmentos de cromosomas, que por alguna razón fueron separados de la cinética de formación celular y quedaron con un pequeño núcleo satélite del original, la hipótesis de que a mayor fluencia de fotones de rayos gamma, mayor ruptura de los cromosomas y por ende mayor probabilidad de formación de micronúcleos, es una de las confirmaciones de este trabajo. (Di Fiore, 1975)

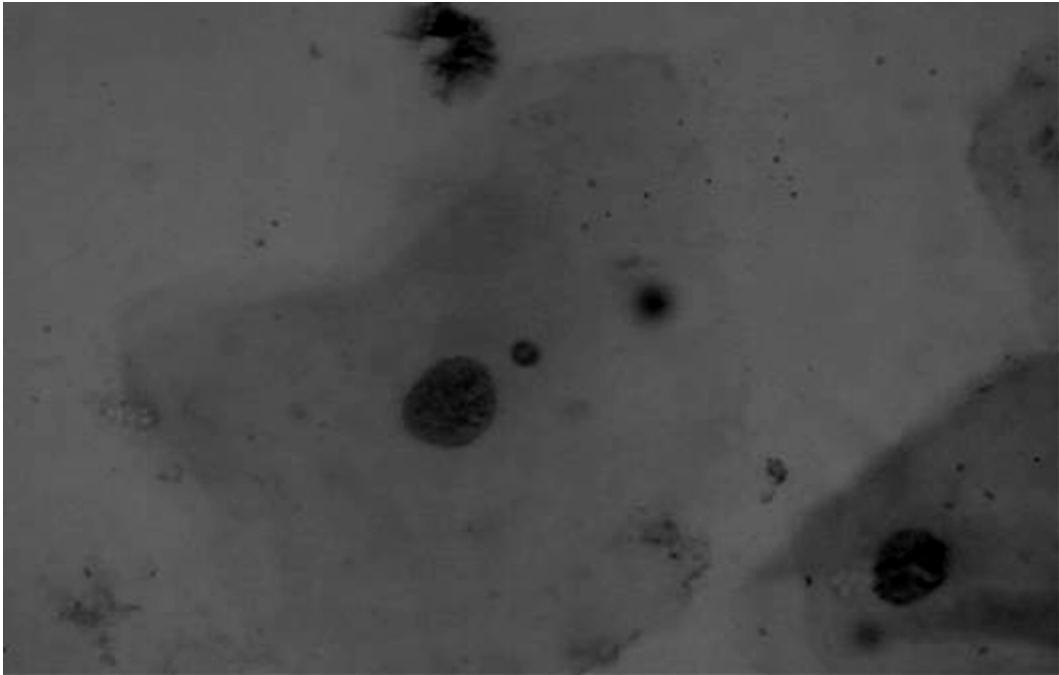


Figura 2. Micro-núcleo cercano al núcleo central, este micro-núcleo contiene material genético desmembrado de los cromosomas.

Sin embargo la dinámica celular y la conformación del tejido epitelial de la mucosa bucal, junto con la variabilidad de los procesos orgánicos en los pacientes oncológicos, hacen que las medidas de los efectos de las radiaciones ionizantes in-Vitro sean más difíciles de describir, que un hecho físico de causa-efecto. (Vallerga et al., 2006)

El tejido epitelial que forma la mucosa bucal es un epitelio estratificado de células planas, las cuales cumplen un ciclo de diez días luego de los cuales son eliminadas, la dificultad radica en que las interacciones de las radiaciones ionizantes que darán origen a un micro-núcleo, ocurren en la capa basal de la mucosa bucal y no en el epitelio. (Di Fiore, 1975)

Es decir las células impactadas por los fotones y cuya interacción origina un micro núcleo-celular deben viajar por así decirlo hasta el exterior del tejido epitelial donde serán recogidos mediante un palillo baja lengua.

Por otra parte los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes son acumulativos en los órganos irradiados, además el tratamiento con radioterapia es loco-regional a la zona de irradiación, sien-

do estas características confirmadas en el presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología de muestreo se efectuó sobre once (11) pacientes, los cuales fueron seleccionados sin discriminar el tipo de tumor ni la zona de irradiación y a quienes se prepararon para recibir su tratamiento en el Instituto Nacional del Cáncer Aregua-Paraguay.

a) A cada paciente se le extrajo una muestra de mucosa bucal antes del inicio de su tratamiento y durante los veinticinco (25) a treinta (30) días consecutivos que completan su tratamiento, con sesiones diarias de radioterapia.

Las muestras de células de la mucosa bucal, son obtenidas mediante un hisopado con espátula de madera a pacientes con cáncer, realizando seguidamente un frotis sobre el portaobjetos limpio, dejándose secar al aire a temperatura ambiente. Se obtuvo cuatro láminas por día y por paciente.

La muestra se fijó en etanol – ácido acético en proporción de 3:1 durante 1 hora, y se dejó secar a temperatura ambiente.

<i>ID</i>	<i>Tasa de Dosis/día</i>	<i>Dosis Total</i>	<i>Días Total</i>	<i>Tipo de Tumor</i>	<i>Estadio</i>
5	2,0	50	20	Ca-cérvix	IIA
11	2,0	50	25	Ca-cérvix	IIIB
12	3,6	59,4	23	Tumor Cerebral	IIIB
13	3,6	48,6	28	Ca-mama	IIIA
29	2,0	54	27	Tumor Cerebral	IVB
39	1,8	36	22	Sarcoma- Maxilar	IA
63	3,6	84,6	24	Ca- Orofaringe	IVB
64	1,8	52,2	29	Tumor Cerebral	IA
76	3,0	30	13	Parótida	Recidiva
77	1,8	50,4	24	Ca-maxilar	IIB
80	3,6	86,4	25	Ca-cérvix	IVB

Tabla 1. Valores de dosis por día de tratamiento y tipo de tumor con su estadio.

Se procedió a realizar la hidrólisis en HCL 1N.

- 5 minutos a temperatura ambiente.
- 10 minutos a 60 °C.
- 5 minutos a temperatura ambiente.

Se transfirió a un cuppling en agua helada (5 °C) durante 5 minutos para cortar la hidrólisis y dejar secar.

Las láminas hidrolizadas fueron colocadas en carbol fucsina durante 20 minutos como máximo en ausencia de luz.

Se lavaron las láminas con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Luego se observaron y se analizaron en microscopios Olympus a 1000x y se llegaron a contar 2.000 células por paciente determinando el número de M.N. y las frecuencias de aparición. (Figura 2)

b) Como control negativo se tomaron 6 perso-

nas no fumadoras, ni sometidas a ningún tratamiento con fármacos o productos naturales, y se procedió con la misma técnica de muestreo de micro-núcleo.

Las fichas de tratamiento de los once (11) pacientes son analizados teniendo en cuenta las dosis de radiación impartidas cada día en la zona de irradiación. Las dosis totales de tratamiento, los días de tratamiento, el tipo de tumor y estadio de evolución tumoral. (Tabla 1)

A cada paciente se le extrajo las muestras de la mucosa bucal durante los 25 a 30 días de tratamiento, con los cual próximamente se leyeron 100 láminas por pacientes, contándose 50.000 células y determinándose la frecuencia de micro-núcleos por día.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez obtenidos los datos de conteos de micro-núcleos de cada muestra diaria y verificada la do-

Planilla de Control Negativo							
S_1	M	T_0	FN	S_2	N	T_0	FN
N	15	1471	1,02		1	2011	0,05
	2	2087	0,10		4	1050	0,38
	1	2010	0,05		5	2000	0,25
	4	2020	0,20		3	2000	0,15
	2	1529	0,13		4	2020	0,20
\overline{MN}		0,30		\overline{MN}		0,21	
σ		0,41		σ		0,12	
CV		1,36		CV		0,60	

Tabla 2. Cantidad de micro-núcleos (MN), y frecuencia de micro-núcleos (FMN) según el sexo de personas sanas y no irradiadas con radiaciones ionizantes.

sis de radiación impartida, se realizó el seguimiento de la variación de las frecuencias de micro-núcleo estimándose una incertidumbre de clase B de 3 %, que correspondería a errores sistemáticos en la obtención de las muestras.

Por otra parte se estimó los valores de control negativo, los cuales son presentados en la Tabla 2

Como se observa en la Tabla 3 los promedios de frecuencia de micro-núcleos en general van aumentando a medida que la dosis de radiación y la gravedad del paciente son mayores.

Los valores promedios de frecuencia de micro-núcleos obtenidos, se deben analizar desde el punto de vista del indicador de las variables dolencia-gravedad y dosis de radiación suministrada, sin embargo las dosis de radiación no están en relación directa con el promedio de micro-núcleos, en especial debido a que el promedio de las frecuencias, se calcula con varias muestras obtenidas durante los días de tratamientos, dando lugar a valores de la muestra sesgados por factores radiobiológicos, como ser el factor de recuperación biológica y la cinética celular.

Por otra parte, no se determinó que el promedio de MN esté en función directa de las dosis totales de tratamiento lo cual corroboraría trabajos ante-

rios (Jianlin et al., 2004; Eliana et al., 2005; Rached et al., 1998; He et al., 2000).

Sin embargo este trabajo establece una relación cuadrática para la dosis de radiación del análisis de cuatro gráficos de Frecuencia de Micro-núcleo Vs. Dosis, mostrados en los Gráficos 1,2,3 y 4, es posible observar que la curva de tendencia cuadrática representa el mejor ajuste, en especial para pacientes cuya zona de irradiación coincide con la zona de extracción de la muestra (mucosa bucal), en donde el coeficiente de correlación representa el 15 % y en las zonas de irradiación alejadas de la zona de extracción representa un coeficiente de correlación mucho menor que el 1%.

Si la zona irradiada es lejana a la zona de cabeza y cuello, pero irradia el tracto gastrointestinal, existe una reacción y un cambio en la cinética de la mucosa bucal, cuyo epitelio recubre todo el aparato gastrointestinal (del cual forma la mucosa bucal), es decir el hecho de irradiar el epitelio en cualquier zona del cuerpo produce una variación del recuento del micronúcleos, sin embargo esto no es posible detectarlo como una función lineal de la dosis, debido al tipo de muestreo y a la cinética celular del tracto basal al epitelio. (Di Fiore, 1975; De Almeida et al. y Sadigursky, 2006)

ID	Dolencia-Gravedad	Dosis (Gy)	Promedio de Frecuencia de MN	(FMN/Gy) 100
5	Carcinoma Escamoso Filtrante - Ca de cérvix IIA .	50,0	0,97	1,94
11	Carcinoma Escamoso Filtrante - Ca de cérvix IIIB .	50,0	0,62	1,24
12	Tumor Cerebral ASTROCITOMA IIIB .	59,4	1,64	2,76
13	Ca de Mama izq. IIIA -Supraclavicular	48,6	0,72	1,48
29	Metástasis Cerebral-CA MAMA IVB	54,0	1,15	2,12
39	Sarcoma Difuso-maxilar Izquierdo.	36,0	1,48	4,11
63	Ca Orofaringe IV-B	84,6	0,61	0,72
64	Tumor Cerebral ASTROCITOMA Pilocítico.	52,2	0,46	0,88
76	Recidiva de Ca Parótida post cirugía.	30,0	0,56	1,86
77	Ca de seno maxilar derecho IIIB .	50,4	0,87	1,73
80	Carcinoma Escamoso IVB	86,4	0,66	0,76

Frecuencia de micro-núcleos en personal no expuesta es de 0,3.

Tabla 3. Valores de dosis impartidas, frecuencia de micro-núcleos y gravedad de las dolencias.

Es de suponer que en regiones en donde la mucosa epitelial no se ve comprometida no exista ninguna correlación con las dosis de radiación, sin embargo se puede observar la figura 4 en donde la misma patología con diferentes estadios fueron tratadas con las mismas dosis obteniéndose diferentes curvas de respuesta de frecuencias de micronúcleos, lo que contradice resultados preliminares de (Eliana et al., 2005), en donde las dosis de radiación mayores generan frecuencias de micronúcleos mayores sin tener en cuenta el estadio de la enfermedad.

La aparente contradicción esta dada en la diferencia de la gravedad de la enfermedad, es decir para un cáncer de cérvix estadio II irradiado a una misma dosis que un cáncer de cérvix de estadio I, la frecuencia de micronúcleos en el primer caso presenta un mayor recuento de MN. (Jianlin et al., 2007; Muller et al., 2002)

La literatura (International Atomic Energy Agency, 1986; Di Fiore, 1975) estima que el rendimiento de MN, esta relacionado con las dosis de radiación por la siguiente ecuación:

$$Y = AD^2 + BD + C$$

Ec-1

En donde las constantes A, B, C son características del tipo de radiación, la fluencia de los fotones y la radiosensibilidad del indicador biológico.

De hecho la estimación de las dosis de radiación mediante indicadores biológicos necesita una gran cohorte (Minodier et al., 2002; Baciuchka et al., 2002; Chandra et al., 2001); de modo a que estos indicadores sean más precisos a dosis altas y gran tasa de dosis sin embargo, para dosis de radioterapia en donde las dosis son fraccionadas y se llegan a dosis altas pero con fracciones baja de las dosis, los factores A, B y C son mayores a los estimados en la literatura (International Atomic Energy Agency, 1986; Vallerga et al., 2006); lo que hace que la estimación posea una incertidumbre asociada respecto a dichos trabajos del orden de 28,04 % (Tabla 4).

La mejor estimación de la ecuación que relaciona las dosis con la frecuencia de MN esta dada por el promedio de los coeficientes para aquellas curvas de mayor coeficiente de correlación R^2 , de modo que la curva que estimaría la dosis se puede escribir como:

$$Y = 1,7 \times 10^{-3} D^2 + 4,69 \times 10^{-2} D + 1.013$$

Ec-2

ID	D (Gy)	Dicentricos (Y) Linfocitos	MN-I131 (Y)	MN-Co-60 (Y)	Dif % Co-60 I-131	ABS de Dif % MN Dicentrico	Error % Promedio
5	2,0	0,73	0,18	0,93	402,8	26,8	
11	2,0	0,73	0,18	0,93	402,8	26,8	
12	3,6	1,20	0,48	0,87	80,6	27,6	
13	3,6	1,20	0,48	0,87	80,6	27,6	
29	2,0	0,73	0,18	0,93	402,8	26,8	
39	1,8	0,69	0,16	0,93	493,5	35,5	28,0 %
63	3,6	1,20	0,48	0,87	80,6	27,6	
64	1,8	0,69	0,16	0,93	493,5	35,5	
76	3,0	0,99	0,35	0,89	152,2	10,5	
77	1,8	0,69	0,16	0,93	493,5	35,5	
80	3,6	1,20	0,48	0,87	80,6	27,6	

Tabla 4. Estimación de porcentaje de frecuencia de micro-núcleos y dicentricos mediante la curva de dosis respuesta medida en: facilidad de teleterapia y iodoterapia con I-131. [International Atomic Energy Agency, 1986; Vallerga et al., 2006]

Se puede notar en la tabla 4 que existe una gran diferencia en el cálculo de la frecuencia de micro-núcleo en función de la dosis para la estimación con I-131 y los cálculos con la función determinada en este trabajo, sin embargo la diferencias son notoriamente menores cuando se calcula de frecuencia de micronúcleos con la función obtenida para los dicentricos en linfocitos irradiados con Co-60.

Los gráficos mostrados en las páginas que siguen denotan las curvas de ajuste y la ecuación de correlación entre las dosis de radiación y la frecuencia de MN detectadas en los pacientes, con distintas patologías. Es de destacar que se encuentran en proceso de evaluación 72 pacientes con diferentes patologías, con los cuales se espera la reducción de la incertidumbre y el aumento en la exactitud de la determinación de la Dosis al paciente con lo que se pretende una conclusión definitiva del presente trabajo.

CONCLUSIONES

La gran variabilidad de los datos y el valor de incertidumbre de clase B, hacen que la estimación de la dosis de radiación impartidas a pacientes de cáncer, tenga una incertidumbre asociada del 30 %, sin embargo se espera una reducción de dicha

incertidumbre a medida que aumente los datos sobre las dosis por fracción de los pacientes a incluir en la estadística.

Es decir manteniendo un mayor muestreo de pacientes y estimando la curva normal para un tratamiento protocolizado estándar se podría determinar la Dosis con una exactitud del orden de 10%, en situaciones de exposiciones normales de tratamiento.

En situaciones de exposición accidental en donde la tasa de dosis es sumamente mayor se espera una incertidumbre del 3% en la estimación de la dosis.

LITERATURA CITADA

- Baciuchka P.M., et al. 2002. Acentromeric micronuclei are increased in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients. *Mutation Research.*, 520: 189-198p.
- Chandra J.G., et al. 2001. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutation Research.*, 491: 9-16p.
- De Almeida Reis S., Ribeiro Do Espírito Santo A., Sadigursky M. 2006. *Cytologic Alterations*

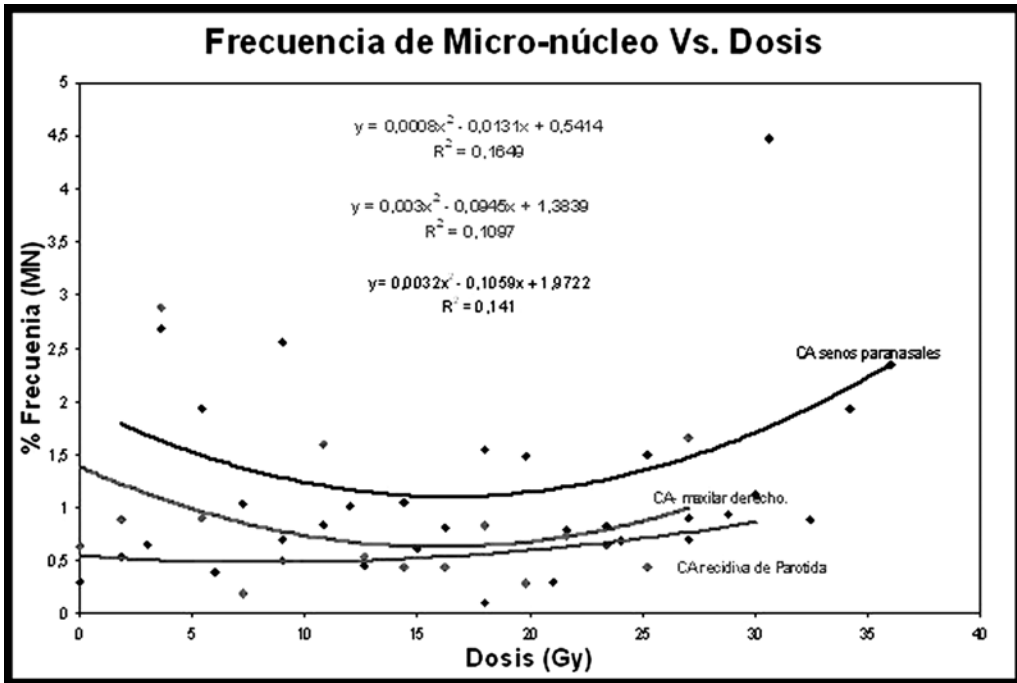


Gráfico 1. Curvas de tendencias que correlacionan las dosis de radiación con la frecuencia de micronúcleos contadas en las muestras bucales, para patologías de cabeza y cuello, con correlación alta.

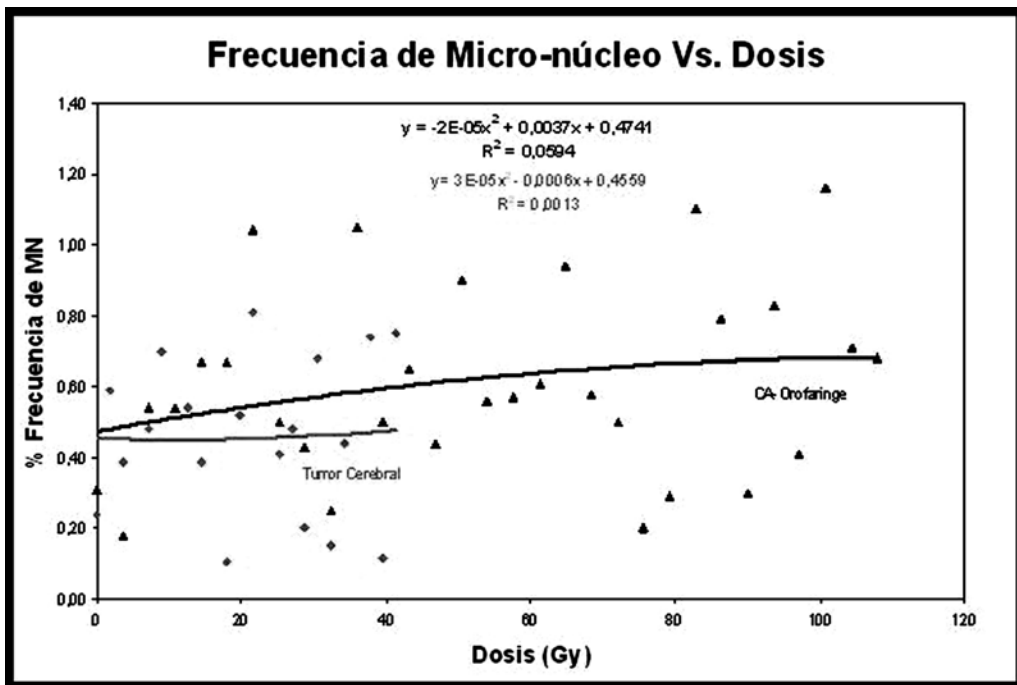


Gráfico 2. Curvas de tendencias que correlacionan las dosis de radiación con la frecuencia de micronúcleos contadas en las muestras bucales, para patologías de cabeza y cuello, con menor coeficiente de correlación.

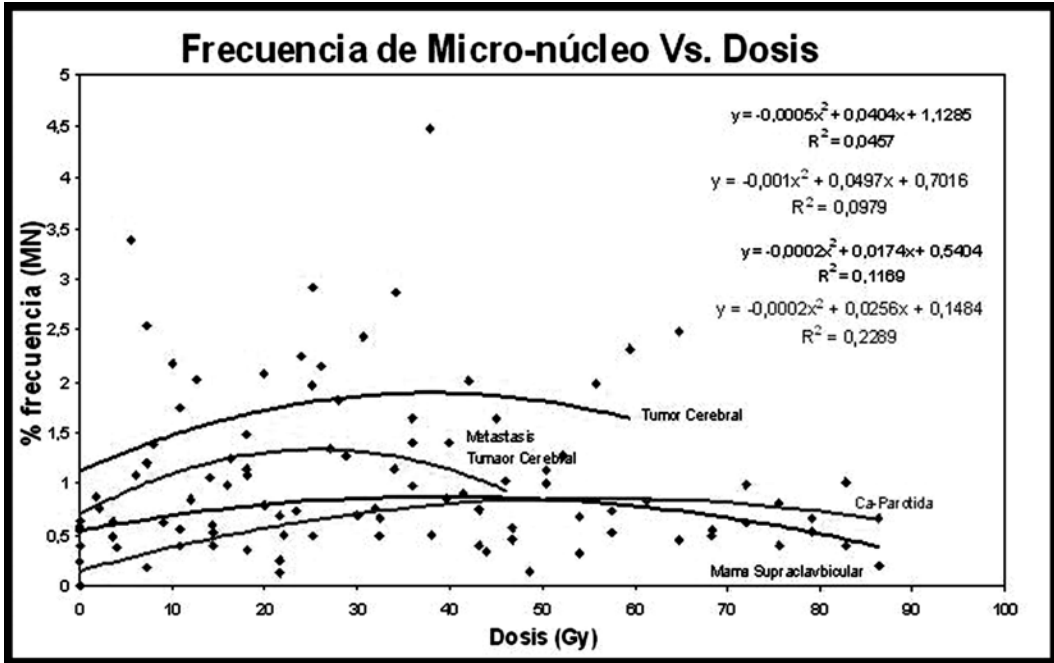


Gráfico 3. Curvas de tendencias que correlacionan las dosis de radiación con la frecuencia de micronúcleos contadas en las muestras bucales, para patologías de cabeza y tumor cerebral, con menor coeficiente de correlación.

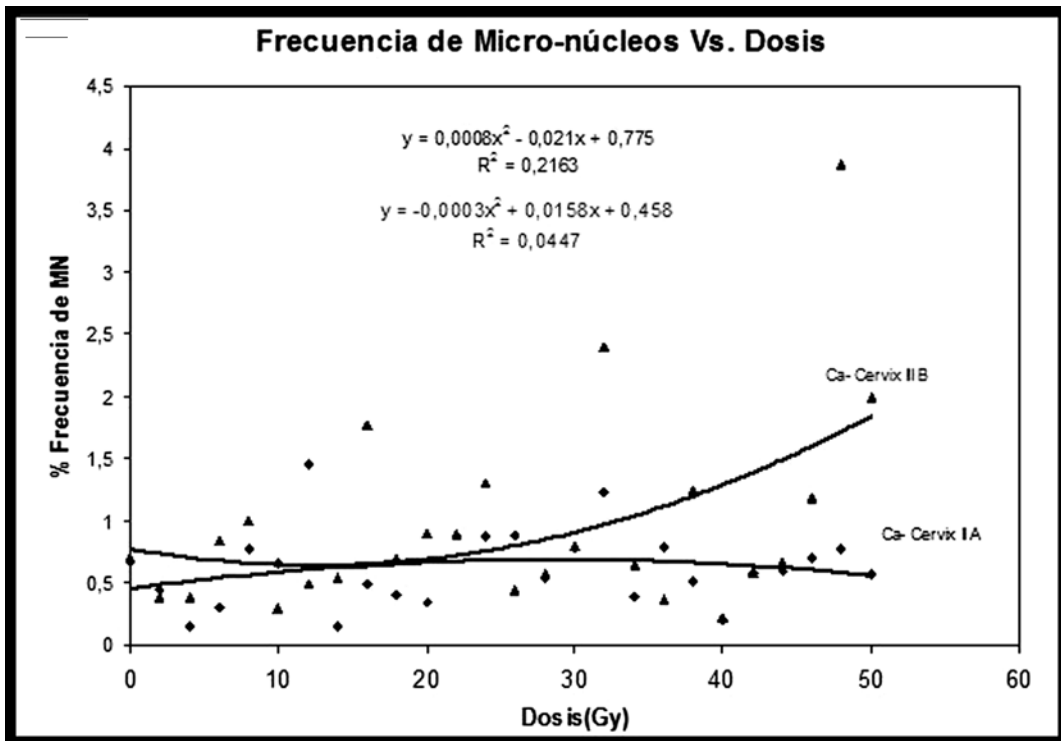


Gráfico 4. Curvas de tendencias que correlacionan las dosis de radiación con la frecuencia de micronúcleos contadas en las muestras bucales, para patologías de cérvix uterino, con menor coeficiente de correlación.

- in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. *J Oral Pathol Med.*, 20(2): 97-102p.
- Di Fiore M.S.H. 1975. *Diagnóstico Histológico*. 1ra Edición. Buenos Aires-Argentina: El ATENEO. 857p
- Eliana M., Minicucci, Pereira A. 2005. Cytogenetic Damage in Circulating Lymphocytes and Buccal Mucosa Cells of Head and neck Cancer patients Undergoing Radiotherapy. *J.Radat. Res*, 46 (2): 135-142.
- Galle P., Paulli R. 2003. *Manual de Biofísica: Radiobiología y Radiopatología*. Barcelona-España: Masson. 248p
- He J.L., et al. 2000. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutation Research*. 46(9): 223-231p.
- International Atomic Energy Agency. 1986. *Biological Dosimetry: chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment*. Viena Austria: Technical Reports. 69p. Series N° 260.
- Jianlin L, Jiliang H., Wei Z. 2007. Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay. *Mutation Research*. 617: 104-110p.
- Lou Jianlin, He Jiliang, Jin Lifan. 2004. Measuring the genetic damage in cancer patients during radiotherapy with three genetic end-points. *Nutagenesis*. 19(6): 457-464p.
- Minodier S., et al. 2002. Cytogenetic monitoring of industrial radiographers using the micronucleus assay. *Mutation Research.*; 521: 37-46p.
- Muller W.U., et al. 2002. Does radiotherapy affect the outcome of the comet assay? *The British Journal of Radiology*. 75: 608-614p.
- Rached E., et al. 1998. No Predictive Value of the Micronucleus Assay for Patients with Severe Acute Reaction of Normal Tissue after Radiotherapy. *Eur J Cancer*. 34(3): 378-383p.
- Suhas S., et al. 2004 Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beady smokers, a high-risk group for oral cancer. *Mutation Research.*; 561:15-21p.
- Vallerga M.B., Cabrejas M, et al. 2006. Dosimetría Biológica de pacientes con carcinoma diferenciado de tiroides tratados con Yodo - 13. In: Congreso Americano del IRPA, 1, Acapulco, México, 2006. International Radiation Association. 4-8p.