

Investigación, mediante técnicas de dosimetría biológica, de posibles efectos sobre la salud por causa de la radiaciones ionizantes de profesionales de líneas aéreas. Estudio poblacional

María Jesús Prieto Rodríguez, Mercedes Moreno Domene, Paola Nava Pérez, Leonor Zapata Hernando y Rafael Herranz Crespo*

I. INTRODUCCIÓN

La radiactividad natural fue puesta en evidencia en 1896 por Henri Becquerel y Pierre y Marie Curie; posteriormente, Irene y Frederic Joliot-Curie descubrieron la radiactividad artificial. Desde entonces se han realizado numerosos trabajos dedicados al estudio de sus efectos.

Nuestros sentidos no perciben la radiactividad a pesar de que puede producir serios daños biológicos, para su detección y cuantificación se ha venido recurriendo a dosímetros físicos (miden la dosis de radiación recibida por un individuo mediante parámetros físicos). Sin embargo, en los casos de exposición a radiaciones en ausencia de dosímetros

físicos, se recurre al estudio de determinados daños biológicos producidos en las personas expuestas para conocer, con cierta aproximación, la cantidad de radiación recibida y poder emprender de forma eficaz las medidas terapéuticas adecuadas.

La dosimetría biológica (DB) comienza su desarrollo a partir de la observación de los efectos que producen en los seres vivos las radiaciones ionizantes. Las primeras evidencias se refieren a los efectos en tejidos externos, tales como la piel, siendo, la radiodermatitis uno de los primeros indicadores biológicos de sobreexposición utilizados, pero sólo se puede hablar de dosímetro biológico, cuando el efecto que se estudia es cuantificable y proporcional a la dosis de exposición.

* Este artículo es fruto de una investigación más amplia, actualmente en curso, que se lleva a cabo por los autores, de acuerdo con el Convenio de colaboración suscrito por el Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Iberia Líneas Aéreas de España y Fraternidad-Muprespa Mutua de Accidentes de Trabajo y Enfermedades Profesionales de la Seguridad Social nº 275.

La dosimetría biológica consiste en la estimación de la dosis absorbida por una persona expuesta a radiaciones ionizantes, utilizando parámetros biológicos. Aunque se han observado numerosas alteraciones producidas por radiaciones a nivel molecular, celular y orgánico, no todas ellas son cuantificables o proporcionales a la dosis, por lo que deben considerarse indicadores biológicos que permiten detectar la existencia de exposición a radiaciones, pero no realizar estimaciones dosimétricas.

El método más sensible para estimar la dosis en exposiciones accidentales sigue siendo el estudio de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica. Esta metodología es especialmente útil en el caso de exposición corporal total, aguda y uniformemente distribuida; sin embargo, la mayor parte de los accidentes radiológicos producen exposiciones corporales parciales, o exposiciones no uniformes, que junto con los casos de exposiciones crónicas o prolongadas en el tiempo complican en mayor o menor grado el estudio. En algunos casos no será posible la estimación de dosis por métodos biológicos, y en otros, será necesario utilizar análisis estadísticos específicos. Otro problema que presenta esta técnica, deriva del carácter inestable de las alteraciones cromosómicas que se analizan, esto hace indispensable obtener la muestra lo antes posible una vez conocido el suceso; en general, no deben transcurrir más de 20-25 días entre la exposición y la extracción de la muestra.

La dosimetría biológica mide los efectos inducidos por las radiaciones ionizantes a nivel biológico, constituye una medida indirecta del grado de exposición a las mismas. A priori puede ser considerado el método dosimétrico idóneo ya que nos refleja exactamente las alteraciones biológicas radioinducidas.

1.1 CARACTERÍSTICAS DE UN DOSÍMETRO BIOLÓGICO

Aparte de permitir la cuantificación de la dosis recibida, existen una serie de requisitos que debe cumplir un dosímetro biológico en el mayor grado posible:

- Simplicidad: La muestra debe ser fácilmente extraíble, y no excesivamente cuantiosa, (orina, sangre...). Tampoco, la metodología debe ser excesivamente compleja.
- Precocidad: Debe medir parámetros que se manifiestan precozmente.
- Rapidez: En cuanto a la obtención de los resultados, para facilitar la atención del individuo.
- Estabilidad: Se refiere a la persistencia del efecto con el tiempo, o bien que se conozca su evolución posterior.
- Reproducibilidad: Susceptible de ser reproducido.
- Relación dosis-respuesta: Que se pueda establecer previamente una relación dosis-efecto.
- Especificidad: Que el efecto que se mide presente la mayor especificidad posible con la causa que lo produce.
- Sensibilidad
- Fiabilidad: Supone que se conozcan las variaciones del parámetro en el hombre, y que la dispersión interindividual no sea excesiva.

Se sigue investigando numerosos indicadores biológicos, pero los citogenéticos se consideran los más fiables por haberse demostrado una buena relación dosis-efecto.

En 1938 se publicaron por vez primera estudios sobre aberraciones cromosómicas inducidas por rayos X en microsporas de la especie *Tradescantia* (Tarsax).

En el año 1956 (Tjio y Levan) determinaron el nº cromosómico de la especie humana, esto fue posible gracias a las mejoras en las técnicas de análisis. Fue en el año 1959 cuando Nowell realizó un hallazgo trascendental para

la evolución de los estudios citogenéticos, descubrió una sustancia capaz de inducir en poco tiempo la división de los linfocitos T en medios de cultivo, la Phitoheماغlutinina que se obtiene fácilmente a partir de la judía común. El desarrollo de las técnicas citogenéticas continuó, y en 1960, Moorhead & Cols las modificaron mejorando la calidad de las metafases de forma que se permitió su estudio mediante microscopía óptica.

Tan pronto como se dispone de esta tecnología, se comienza a demostrar que las radiaciones ionizantes producen aberraciones cromosómicas en las células humanas, tanto en cultivo *in vitro* como en los individuos *in vivo*, comprobándose lo que ya se había observado anteriormente en las plantas.

Se fueron desarrollando las curvas de calibración dosis-efecto, y aplicando para el cálculo de dosis en individuos accidentalmente expuestos a radiaciones ionizantes (RI), siendo el primer caso publicado el de Bender & Col en 1962. Se puede decir que a finales de los 60 la técnica estaba ya bien establecida. Por último, en 1974 Peter y Wolf desarrollaron una técnica especial de tinción cromosómica diferencial conocida como FPG (Fluorescencia Plus Giemsa), que permite distinguir entre las metafases de primera división mitótica y las procedentes de una segunda división.

1.2 INDICACIONES DE LA DOSIMETRÍA BIOLÓGICA

La dosimetría biológica pretende aclarar dudas y resolver problemas cuando las circunstancias así lo requieren, complementando los métodos físicos.

Está indicada en los siguientes casos:

Cuando la dosimetría física indica sobreexposiciones que han ocurrido en circunstancias bien definidas, se pueden comparar los valores obtenidos con ambas metodologías.

Cuando la irradiación no es uniforme, la D.B permite aproximaciones más válidas a la dosis media recibida por el cuerpo.

Cuando la dosimetría física muestra sobreexposiciones inexplicables, situaciones en las que se sospecha que la persona en cuestión no era portadora del dosímetro.

En irradiaciones accidentales de personas que no están sometidas por su trabajo a RI y, por tanto, no son portadoras de dosímetro personal.

2. RADIACIONES IONIZANTES Y ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

La dosimetría biológica se basa en el estudio de las alteraciones cromosómicas que se producen en los linfocitos de la sangre periférica. Ha sido a partir de los años 50 cuando se han desarrollado estas técnicas, y fue en el inicio de los 60 cuando se comenzó a utilizar en personas expuestas de forma accidental a radiaciones ionizantes (RI).

Se han realizado numerosos estudios que demuestran que la irradiación *in vitro* o *in vivo* de los linfocitos sanguíneos produce idénticas alteraciones en los cromosomas por cada dosis de irradiación, permitiendo de esta forma, una relación entre los niveles de aberraciones observados en las personas expuestas, con una curva dosis-efecto producida *in vitro*.

También se ha visto que la vida media del linfocito es de 3,5 años aproximadamente. Cuando se presenta un supuesto caso de sobreexposición, la muestra sanguínea se debe obtener entre las 6 horas y el primer mes del accidente.

La exposición a radiaciones ionizantes induce en los cromosomas roturas, que dan lugar a una nueva recombinación. La producción de estas lesiones está directamente relacionada con la acción de las radiaciones ionizantes sobre el ADN, y con los mecanismos de reparación enzimática, que pueden resultar en la

restauración total o en la formación de aberraciones cromosómicas.

2.1 ACCIÓN DE LAS RADIACIONES SOBRE ESTRUCTURAS BIOLÓGICAS

Dependiendo del lugar en el que se produzcan las interacciones, la acción de las radiaciones ionizantes se puede clasificar en directa o indirecta.

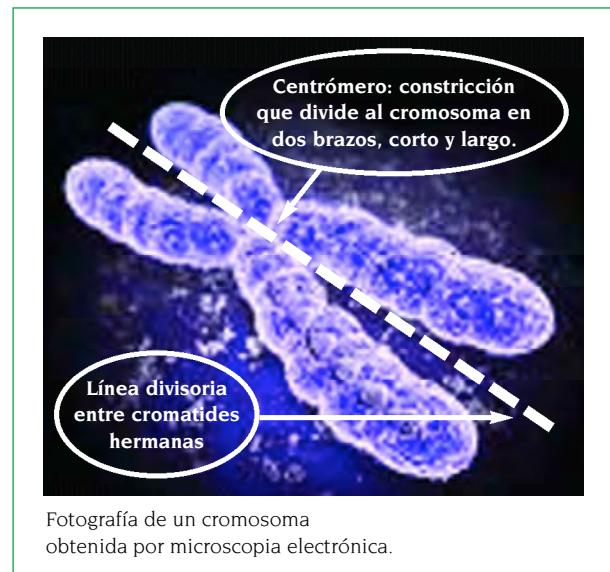
- **Acción Directa:** La radiación ionizante es absorbida por una macromolécula biológica (DNA), de forma que el daño se produce por la absorción directa de energía y la consiguiente ionización de la macromolécula biológica. Son más frecuentes en las radiaciones de alta LET
- **Acción Indirecta:** Implica la absorción de la RI por el medio en que están suspendidas la moléculas, este es fundamentalmente el agua, que al absorber la energía se hidroliza produciendo radicales libres, principalmente el radical hidroxilo OH⁻, que tiene gran poder de difusión y de toxicidad para las macromoléculas biológicas. Las radiaciones de baja LET actúan en el 80% de los casos de forma indirecta.

Las radiaciones ionizantes producen numerosos tipos de lesiones en el DNA de las células expuestas: Rotura de una hebra de la doble hélice, rotura de las dos hebras de la hélice, uniones cruzadas DNA-Proteína, uniones cruzadas inter- o intra-hélice, lesión a una base nitrogenada, lesión del enlace azúcar-fosfato, pérdida de una base nitrogenada, etc.

Las células disponen de unos complejos mecanismos de reparación enzimática que entran en funcionamiento ante cualquier tipo de lesión en el DNA, de esta forma sólo una pequeña fracción del daño inducido se manifiesta en aberraciones cromosómicas. Es importante resaltar que la radiaciones no inducen nuevos tipos de aberraciones cromo-

sómicas, simplemente aumentan la frecuencia con respecto a los niveles basales.

Las células se dividen mediante un mecanismo denominado mitosis y al periodo comprendido entre dos mitosis se le denomina interfase, dentro de la interfase se produce la síntesis del DNA, dando lugar a la subdivisión de la interfase en 3 periodos más: S (síntesis), G1 y G2. (G1: Periodo comprendido entre el final de la mitosis y el principio de la fase S. G2: Periodo comprendido entre el final de la fase S y el principio de la mitosis) Cuando la célula está en reposo, entendiéndose por reposo, como que la célula está en fase no cíclica, se dice que la célula está en fase G0. Es importante recordar que los cromosomas presentan diferente morfología externa en cada una de las fases de la mitosis, siendo la metafase la elegida para los estudios citogenéticos, por ser en la que se aprecia mejor la estructura cromosómica, y en consecuencia la que permite diferenciar los cromosomas normales de los aberrantes.



2.2 ABERRACIONES CROMOSÓMICAS RADIOINDUCIDAS

A través de la asociación de la molécula de DNA con proteínas, se produce una conden-



Fotografía obtenida por microscopía óptica (100x) de linfocitos humanos en metafase teñidos con giemsa

sación y superenrollamiento que da lugar a los cromosomas, estas estructuras son visibles al microscopio óptico, y su morfología está claramente analizada durante la metafase, esto permite la visualización del daño ocasionado en la molécula de DNA, a través de alteraciones a nivel cromosómico.

Las aberraciones cromosómicas radioinducidas consisten en una variedad de intercambios y deleciones, que se pueden clasificar en cromosómicas o cromatídicas dependiendo de la fase del ciclo, G1 o G2 respectivamente, en la que se realice la exposición a RI, esto es si se produce antes o después de la fase de síntesis.

- **Cromosómicas:** Son debidas a lesiones producidas en las fases G0 o G1 del ciclo celular, es decir previa a la síntesis, por lo que el daño afectará al cromosoma completo, manifestándose en la mitosis en ambas cromátidas.
- **Cromatídicas:** Son debidas a lesiones producidas cuando ya se ha completado la fase de síntesis, es decir en G2, el daño que se observará en metafase se corresponderá con la cromátide afectada, no en el cromosoma completo.

Como los linfocitos están en fase G0 el daño radioinducido será de tipo cromosómico.

Existen una serie de agentes conocidos como S-dependientes, solo producen alteraciones de tipo cromatídico, puesto que sólo producen lesiones en las células que se encuentran en periodo de síntesis, por ejemplo la luz ultravioleta y otros agentes químicos.

Las aberraciones cromosómicas, también se pueden clasificar por el número de roturas que se han producido, y por las interacciones entre ellas:

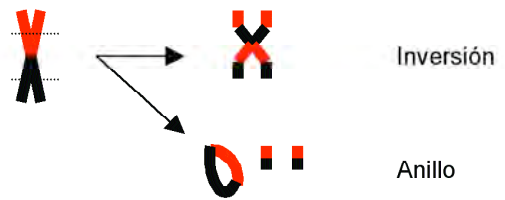
- **1 rotura:** La mayoría de las roturas radioinducidas van a ser reparadas enzimáticamente por la célula, si esto no ocurre se manifestará en la metafase como una deleción también llamada fragmento acéntrico.
- **2 o más roturas:** Se pueden producir en el mismo cromosoma, o en cromosomas diferentes, que darán lugar a recombinaciones

FIGURA 1: DISTINTAS ALTERACIONES SEGÚN LA ROTURA CROMOSÓMICA

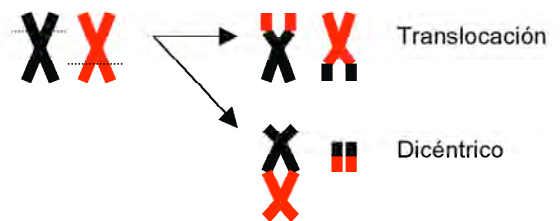
Una rotura en un cromosoma



Dos roturas en un cromosoma



Dos roturas en 2 cromosomas



entre ellos. Para simplificar nos referiremos a dos roturas exclusivamente.

Por el tipo de combinación pueden ser :

- **Simétricas**, cuando la porción del cromosoma que lleva el centromero se une a los fragmentos acéntricos distales.
- **Asimétricas**, cuando las porciones del cromosoma que llevan centromero se unen entre si y lo mismo para los fragmentos acéntricos distales.

Cuando las roturas se producen **en el mismo cromosoma** la combinación será un cambio **interno**, que se conoce como *inversión* cuando es simétrico y como *anillo + fragmento* si es asimétrico.

Cuando las dos roturas se producen **en diferentes cromosomas**, se trata de intercambios. Si la recombinación asimétrica da lugar a una *traslocación recíproca* y si es asimétrica a un *dicéntrico + fragmento*.

Atendiendo a la persistencia de la aberración cromosómica tras sucesivas generaciones celulares, estas se pueden clasificar en dos grupos:

- **Estables**: Son aquellas que permiten la división celular, por tanto persisten en sucesivas divisiones, ej: traslocaciones.
- **Inestables**: Dificultan la división celular, por tanto se perderán. Son las deleciones y las recombinaciones cromosómicas asimétricas, ej: dicéntricos.

3. DOSIMETRÍA BIOLÓGICA CLÁSICA

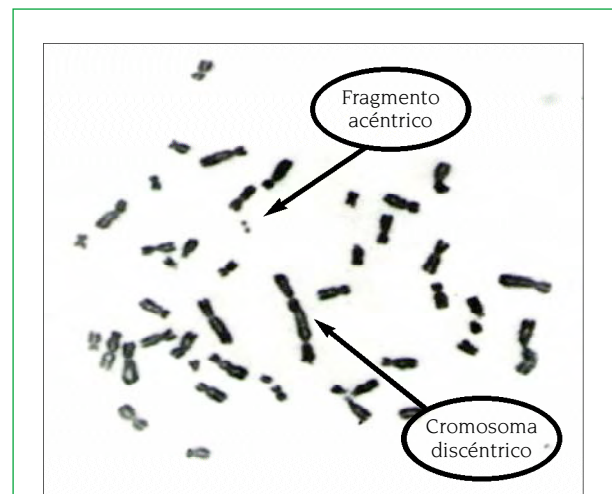
Consideramos dosimetría biológica clásica al estudio de las alteraciones cromosómicas inestables (anillos y dicéntricos) inducidas en los linfocitos de sangre periférica.

Los linfocitos se encuentran en el organismo en fase G₀ o fuera del ciclo celular, al ser irradiados, se producen roturas en su DNA

que activan los mecanismos de reparación enzimática, normalmente se produce la restauración total eliminándose todas las lesiones, pero en algunos casos esto no es posible y como consecuencia la célula puede llegar a presentar alteraciones cromosómicas. Si se produce una rotura en un cromosoma que no es reparada, se observarán deleciones, que se manifiestan como fragmentos acéntricos durante la metafase. La reparación incorrecta de dos roturas en un mismo cromosoma puede dar lugar a la formación de anillos e inversiones, y si suceden en dos cromosomas diferentes a traslocaciones y dicéntricos.

La dosimetría biológica por tanto, abarca múltiples métodos capaces de detectar cambios inducidos por radiaciones ionizantes a nivel molecular, citogenético y celular, estos cambios pueden ser utilizados para obtener estimaciones de dosis absorbida. Biológicamente están basados en las lesiones que las radiaciones ionizantes producen en el DNA, y las diferentes metodologías se refieren a las implicaciones que se producen a los diferentes niveles biológicos.

Para la estimación de dosis en individuos con sospecha de sobreexposición a radiaciones



Fotografía obtenida por microscopía óptica (100x) de linfocitos humanos en metafase teñidos con giemsa en la que se observa un cromosoma dicéntrico y su correspondiente fragmento.

ionizantes, se utilizan en la actualidad los dicéntricos y tricéntricos, puesto que aunque sean aberraciones cromosómicas inestables, dentro de ellas representan el 60% de las producidas por irradiación aguda. Además tienen dos claras ventajas: Su frecuencia basal es relativamente baja (1/1.000 células analizadas), y la presencia de dos centrómeros le da una apariencia muy peculiar y fácilmente reconocible al microscopio.

El problema de su inestabilidad, queda parcialmente resuelto mediante la estimación del porcentaje de primeras divisiones, que se puede realizar incorporando al medio de cultivo Bromodeoxiuridina (BrDU) y realizando la tinción FPG descrita en 1974 por Perry y Wolf.

La BrDU es un análogo de la timidina. Durante la fase de síntesis el DNA incorpora el BrDU presente en el medio a su cadena en el lugar de la timidina, de forma que tras la síntesis la doble hélice de DNA estará formada por una cadena con T normal (la que ha servido de molde) y la otra cadena presentará BrDU en el lugar donde debiera haber T.

Para su diferenciación al microscopio, se realiza la tinción FPG, que lleva consigo diferentes tratamientos:

Se utiliza Hoechst 33258 que se une a la BrDU del DNA y sufre fotólisis bajo la acción de la luz UV. De esta forma se rompen las cadenas que contienen BrDU.

Se utiliza el colorante giemsa para la tinción cromosómica.

El resultado observable al microscopio será: las células que se encuentren en primera división, llevan en ambas cromátides una cadena normal y la otra con BrDU, por tanto se teñirán con igual intensidad. Por el contrario las metafases procedentes de una segunda división en un medio que contiene BrDU, presentarán una de sus cromátides con las dos cadenas con BrDU, por tanto cada cromoso-



Fotografía obtenida por microscopía óptica (100x) de linfocitos humanos en metafase. Técnica FPG, 2ª división mitótica en cultivo con BrDU.

ma presentará sus cromátides teñidas con diferente intensidad.

3.1 METODOLOGÍA

La primera vez que se utilizó esta técnica fue en 1962, cuando Bender y Coach estimaron las dosis recibidas por tres personas expuestas de forma accidental en Handford USA. Desde entonces se ha estandarizado internacionalmente.

- Obtención y tratamiento de las muestras: Se realiza según la técnica de Moorhead & Col adaptada. Consiste en el cultivo de sangre periférica en medio específico para el crecimiento de los linfocitos estimulados con PHA durante 48 horas, se utiliza colchicina como inhibidor mitótico durante las dos últimas horas de cultivo. Las preparaciones se obtienen tras choque hipotónico con CLK (0.075 M) y fijación con carnoy (metanol y ácido acético en proporción 3:1). Posteriormente se lleva a cabo la tinción sólida con giemsa y FPG para ver el % de segundas divisiones.

- Estudio citogenético: Se analizan 500 metafases completas por individuo, anotando todas las aberraciones cromosómicas que se encuentren.

3.2 ESTIMACIÓN DE DOSIS

Se lleva a cabo mediante curvas de calibración dosis-efecto realizadas in vitro. Basándonos en que la irradiación in vivo e in vitro produce igual tasa de cromosomas dicéntricos, podemos comparar los resultados del análisis con las curvas de calibración obtenidas previamente al irradiar muestras sanguíneas a dosis conocidas. Para la estimación de la dosis es importante la elección de la curva correspondiente, ya que cada tipo de radiación produce curvas diferentes, en general radiaciones de baja LET producen curvas que se ajustan a un modelo lineal cuadrático donde: $y = c + aD + bD^2$, mientras que las radiaciones de alta LET producen curvas que se ajustan a un modelo lineal: $y = c + aD$. En ambos casos, “y” es la tasa de dicéntricos, “a” y “b” son los coeficientes que definen la curva; “c” es la frecuencia basal de este tipo de alteraciones, es decir, la fre-

cuencia de aparición de dicéntricos en poblaciones no expuestas cuyo valor varía dentro de un rango de 0 a 2,35 por 1.000 células; “D” es la dosis estimada, representa la dosis equivalente, uniforme y a cuerpo entero, que se obtiene con un límite de confianza del 95%. El límite inferior del método de 100mGy para radiaciones de baja LET y de 50 mGy para radiaciones de alta LET.

La estimación de dosis no siempre es fácil y, en muchos casos, depende de las condiciones del suceso:

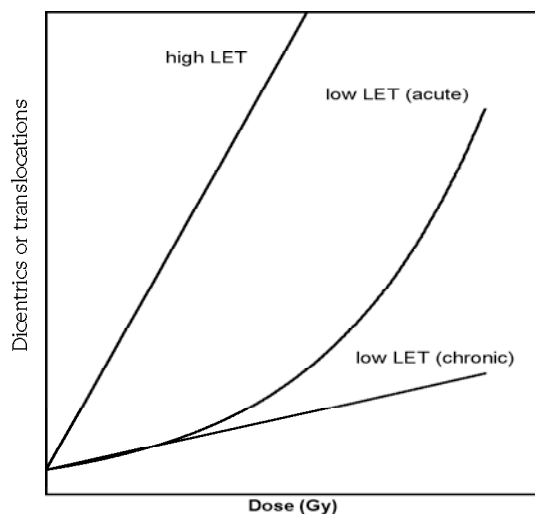
- Estimación de dosis tras exposición aguda a cuerpo entero:

Se obtienen las mejores estimaciones de dosis, según se ha podido comprobar experimentalmente utilizando maniqués y medidas físicas obtenidas mediante dosímetros de termoluminiscencia, comparadas con las estimadas por dosimetría biológica. Sin embargo, las exposiciones uniformes en los accidentes radiológicos son excepcionales, y al aumentar la no uniformidad, aumenta la incertidumbre en las estimaciones dosimétricas por métodos biológicos.

- Estimaciones de dosis tras exposiciones parciales y no homogéneas:

Las exposiciones no homogéneas, pueden derivar de la diferente absorción de la radiación entre los tejidos blandos y los huesos, como consecuencia, se produce una fluctuación en las dosis locales resultantes, dando lugar a diferentes exposiciones de los linfocitos, en volúmenes variables de la fracción del cuerpo. La situación se complica aun más, por el hecho de que en un cierto tiempo, solamente 3-5% de los linfocitos totales de una persona sana adulta, residen en la sangre periférica, con un tiempo de residencia media de alrededor de 20-30 min. La mayoría de los linfocitos están almacenados en tejidos linfáticos y otros órganos, pudiendo recircular en

GRÁFICA I: CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA ALTA Y BAJA LET



la sangre periférica. Por ello, en una exposición parcial del cuerpo, siempre estamos manejando una población de linfocitos expuestos y otra de no expuestos. Especialmente a dosis altas se producen varios fenómenos como transformación de los blastos (reducida), retraso mitótico, y muerte en interfase, que van a dar lugar a una selección preferencial de las células altamente dañadas, y a una posible confusión en la interpretación de los datos sobre alteraciones cromosómicas. De esta forma se explica, porque en algunos accidentes con dosis muy altas, localizadas en zonas muy determinadas (manos, dedos...), a pesar de tratarse de dosis muy altas, la frecuencia de aberraciones cromosómicas es tan baja, que no permite su utilización como dosímetro biológico.

Sin embargo, en exposiciones localizadas que afectan a una mayor proporción corporal, se pueden realizar análisis estadísticos de las aberraciones cromosómicas encontradas, y obtener una dosis estimada para la fracción del cuerpo irradiada. Existen dos métodos, basados en principios similares: 1/ Método Poisson "contaminado" de Dolfín y 2/ Método "Qdr" de Sasaki. La aplicación práctica de estas aproximaciones se ha demostrado eficaz en la reconstrucción de dosis del accidente de radiología industrial ocurrido en San Salvador, en el cual, 3 hombres recibieron unas dosis muy altas de radiación gamma procedente de una fuente de Co-60; 35 días después del accidente, la distribución intercelular de las aberraciones, estaba significativamente sobredispersada. La utilización de ambas aproximaciones matemáticas dio lugar a estimaciones comparables entre 3 y 8 Gy al 90% del cuerpo, al compararla con la dosis equivalente al cuerpo entero, se observó que la reconstrucción de dosis en

términos de exposición parcial del cuerpo, era más real para los 3 casos.

- Estimaciones de dosis tras contaminación interna con radionucleidos:

La contaminación interna con radionucleidos, que presenta una deposición selectiva, puede dar lugar a una exposición no homogénea, con dosis muy altas a los órganos, y no necesariamente a la sangre, por ello las estimaciones dosimétricas, utilizando la metodología descrita, no va a ser posible en muchos casos. Sin embargo, existe un caso especial en el cual se ha demostrado su utilidad, es el caso de la contaminación interna debida a la inhalación o ingestión de tritio. El tritio es incorporado al agua corporal produciendo una irradiación más o menos uniforme, la vida media del tritio es de 10 días, por tanto la exposición puede ser tratada como crónica y uniforme, en la práctica la relación dosis-respuesta será lineal. En ausencia de una curva de calibración específica para el tritio, se puede utilizar una curva de rayos X (200-300 kVp), ya que se ha demostrado que proporciona estimaciones de dosis similares.

3.3 IMPORTANCIA DE LA FRECUENCIA BASAL DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN DOSIMETRÍA BIOLÓGICA

Cuando se analiza un caso de un individuo sobreexpuesto a radiaciones ionizantes por el método citogenético de dosimetría biológica, no se dispone del dato previo de la frecuencia de aberraciones que presentaba ese individuo antes del suceso de exposición. Por este motivo es muy importante poder establecer una frecuencia basal poblacional de grupos lo más homogéneos posibles.

En las publicaciones existentes de este tipo de estudios, las frecuencias varían entre 0.0

en una población de recién nacidos de Edimburgo (Bucton y Evans 1986) hasta 2.8/1000 células en Brookhaven (Bender y Preston 1986).

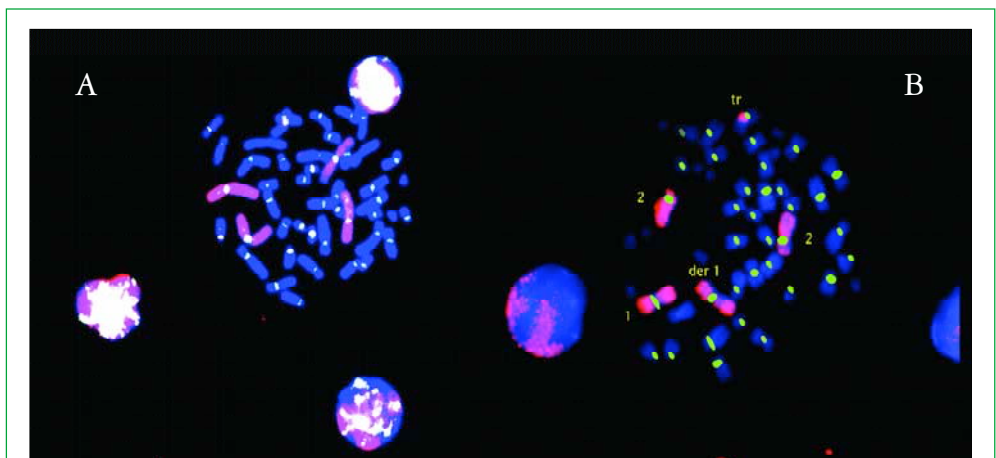
Con estos datos se puede establecer la media de 1.3/1.000 células como frecuencia basal, pudiendo considerarse a efectos prácticos que la presencia de 1 dicentrico en 500 células se corresponde con la frecuencia basal. Existen una serie de factores que pueden influir en esta frecuencia de aberraciones en el público en general: exposiciones médicas a rayos X de forma rutinaria, medicaciones tales como la quimioterapia, alteraciones genéticas asociadas con fragilidad cromosómica, enfermedades neoplásicas, edad (parece que existe un aumento con la edad), etc.

La primera vez que se utilizó esta técnica, fue en 1962, cuando Bender y Coach estimaron la dosis recibida por 3 personas expuestas de forma accidental en Handford USA, desde entonces ha mejorado bastante, y se utiliza de forma rutinaria en protección radiológica.

4. HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH)

Actualmente se utiliza la Técnica de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) mediante la cual se analizan alteraciones cromosómicas estables (traslocaciones). Éstas, a diferencia de los dicéntricos permanecen durante sucesivas divisiones celulares lo que permite estimar dosis en exposiciones crónicas y no estar

afectada por el tiempo transcurrido entre la exposición y la extracción de la muestra, además de proporcionar estimaciones de dosis más exactas, permite su utilización en accidentes ocurridos tiempo atrás. La técnica se basa en el desarrollo de sondas de DNA marcadas con fluorocromos, que se fijan específicamente a determinadas secuencias de DNA situadas en los cromosomas, de forma que se puede marcar de forma diferencial cromosomas completos lo que se conoce como “pintar cromosomas”. Básicamente consiste en seleccionar los cromosomas que se quieren pintar de forma que se van a detectar las translocaciones en las que éstos estén implicados, y extrapolar a todo el genoma. Las frecuencias observadas para los cromosomas pintados, el punto crítico estará determinado por la cantidad de genoma que es necesario “pintar” para permitir dicha extrapolación, sin que llegue a producirse una excesiva complejidad que disminuya la simplicidad del estudio y encarezca demasiado la técnica. La metodología empleada es la misma que en el caso de la dosimetría biológica clásica hasta que se fijan los cromosomas con carmoy, una vez fijados los portas no se tiñen y se almacenan a -80°C hasta que se realiza la hibridación. En nuestro Centro utilizamos un sistema bico-



Fotografía obtenida con microscopio de fluorescencia (100x) de linfocitos en metafase utilizando la técnica FISH: Painting de los cromosomas 1 y 2 y pancentromérica. A: metafase normal. B: metafase con una traslocación recíproca que afecta al cromosoma 1.

lor, mediante el cual marcamos con rodamina (coloración roja) los cromosomas 1 y 2 (16% del genoma total) y con FITC (color verde), todos los centrómeros; con este sistema podemos identificar todos los intercambios que se produzcan entre los cromosomas 1 y 2 y el resto del genoma y además diferenciar las aberraciones cromosómicas estables (translocaciones) de las inestables (dicéntricos).

5. OTRAS TÉCNICAS

Las técnicas anteriores son las más utilizadas para estimaciones de dosis individuales, en los casos de emergencias radiológicas en los que se producen sobreexposiciones accidentales a radiaciones ionizantes. Sin embargo, dado que poseen algunas limitaciones, en muchos casos se utilizan también otras técnicas que se mencionan a continuación:

- **Test de micronúcleos:**
Se utiliza para evaluar el efecto genotóxico de múltiples agentes ambientales, incluyendo las radiaciones ionizantes. Los micronúcleos se forman a partir de los fragmentos acéntricos y cromosomas completos que se separan durante la mitosis y que son incapaces de unirse a ninguna de las células hijas, estos permanecen en el citoplasma celular, toda esta cromatina atípica se manifiesta al microscopio como micronúcleos, su frecuencia está relacionada con la dosis de exposición, por lo que con curvas de calibración, se puede estimar la dosis de forma similar a la descrita para dicéntricos.
- **Test GPA:**
Consiste en el análisis de mutaciones en el gen de la glicoforina, puede ser utilizado incluso largos periodos después de la exposición, pero presenta limitaciones individuales debidas al genotipo, y solo se puede utilizar en exposiciones con dosis muy altas.

Consiste en el análisis de mutaciones en este gen, a través de la proteína para la que codifica, que es un antígeno de superficie de los eritrocitos, se detecta mediante anticuerpos monoclonales y citometría de flujo.

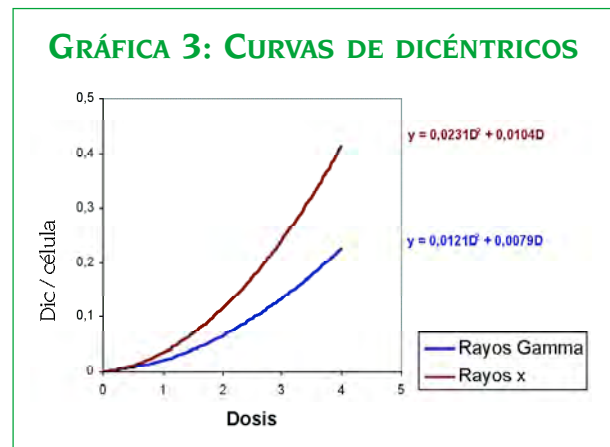
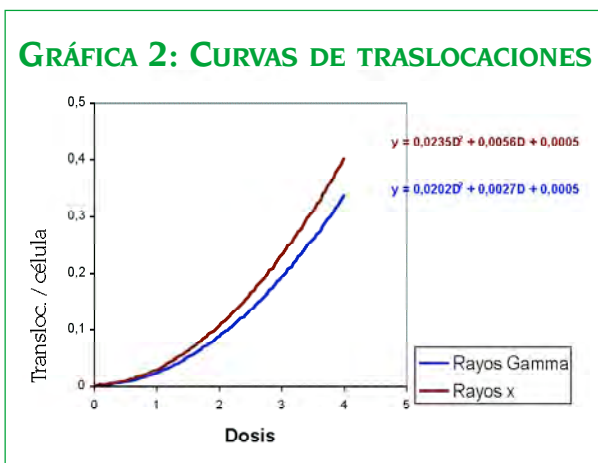
- **Técnica COMET:**
Mediante esta técnica, se analiza individualmente cada célula, de forma que a través de marcajes fluorescentes, se observa la cantidad de cromatina dañada. Se denomina COMET, por la apariencia de cometa que presentan los núcleos dañados, la “cola” será mayor cuanto mayor sea la dosis, se pretende establecer una relación entre la dosis y la “cola” del cometa, para su utilización como dosímetro biológico. Permitiría estimaciones de dosis localizadas, ya que se analizan células individuales.
- **Cromosomas Prematuramente condensados (PCC):**
Este método, variante de la técnica clásica de citogenética, es más rápido, permite igualmente encontrar por una enumeración de ciertas aberraciones cromosómicas (fragmentos) un valor de dosis absorbida. El método se apoya en los trabajos de Jonson y Rao (1970), según los cuales las células en mitosis son fusionadas con células en interfase (estado G₀ del ciclo celular), los compuestos mitóticos de las primeras inducen sobre el núcleo de las segundas una disolución de su envoltura nuclear y una condensación prematura de sus cromosomas.
Los linfocitos sanguíneos interfásicos serán fusionados en presencia de “polietilenglicol” (PEG), con “células de ovario de hamster chino (CHO)” en mitosis. Las células híbridas obtenidas pueden ser bloqueadas por la colchicina y presentaran después sus 46 cromosomas en un estado similar al observado en “profase”, pues la condensación de los cromosomas refleja el estado de

la célula en el momento de su fusión. Los cromosomas de células de hamster se distinguen fácilmente de las de linfocitos humanos por su forma y su coloración. No obstante la forma de los cromosomas así obtenidos no permite la detección de dicéntricos y se revela difícil para los anillos. Por el contrario, el número de fragmentos acéntricos y en cierto casos de “minutes”, son cuantitativamente correspondientes a la dosis. La sensibilidad de este análisis parece ser superior al de enumerar las anomalías cromosómicas (del orden de 0,06 Gy para rayos x y 100 células analizadas).

6. EXPERIENCIA DEL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN

6.1 ELABORACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA RAYOS X, γ Y NEUTRONES

El Laboratorio dispone de curvas de calibración para todos los tipos de energías (rayos x, gamma y neutrones), mediante la técnica de citogenética clásica (dicéntricos) y mediante la técnica FISH. Todas las curvas han sido realizadas y analizadas por personal del propio hospital,



aunque en algunos casos la irradiación de las muestras se ha llevado a cabo en otros centros.

6.2 OBTENCIÓN DE LA FRECUENCIA BASAL DE DICÉNTRICOS EN DISTINTAS MUESTRAS DE POBLACIÓN

Para realizar estimaciones de dosis es indispensable disponer de estudios de frecuencia basal. Como es imposible disponer de la frecuencia basal de aberraciones en cada caso particular, lo que se hace es establecer esta frecuencia en determinados grupos de población.

Como se menciona con anterioridad, existen publicaciones sobre la frecuencia de dicéntricos en distintas poblaciones que varían entre 0,0 dic/1000 células en una población de recién nacidos de Edimburgo hasta 2,8 dic/1000 células en una población cercana a Brookhawnen, estimándose una media de 1.3 dic/1000 células y considerándose que un dicéntrico en 1000 células analizadas es una frecuencia de fondo.

En el HGUGM se han llevado a cabo dos estudios de frecuencia basal con dicéntricos, el primero de ellos se realizó en una muestra de población no expuesta a radiaciones ionizantes por motivos profesionales ni médicos y que pertenecían a la Comunidad Autónoma de Madrid. El segundo se realizó en personal

expuesto a bajas dosis de radiación (personal del Sº de radiodiagnóstico del propio hospital). La idea era ver si existían diferencias entre las dos poblaciones.

En la actualidad se está realizando un estudio de población en tripulaciones aéreas, utilizando la técnica FISH.

Población de la Comunidad Autónoma de Madrid

Para este estudio se seleccionaron 72 individuos sanos nacidos en Madrid o con más de 30 años de residencia. Era imprescindible que no hubiesen estado expuestos a radiaciones ionizantes ni por motivos profesionales ni sanitarios. Como aparece en la tabla: 36 mujeres (M) y 36 varones (H) y agrupados en intervalos de edad entre los 18 y los 65 años, es decir, la vida laboral de un individuo. Se tenían en cuenta también el consumo de cigarrillos (F y NF). Se analizaron un total de 36000 metafases

EDAD	F		NF	
	H	M	H	M
18-20	3 // 1500	3 // 1500	3 // 1500	3 // 1500
20-30	3 // 1500	3 // 1500	3 // 1500	3 // 1500
30-40	3 // 1500	3 // 1500	3 // 1500	3 // 1500
40-50	3 // 1500	3 // 1500	3 // 1500	3 // 1500
50-60	3 // 1500	3 // 1500	3 // 1500	3 // 1500
60-65	3 // 1500	3 // 1500	3 // 1500	3 // 1500

Se estimó una frecuencia de 0.7 dic/1.000 células.

Se realizó el análisis estadístico de los resultados en colaboración con la NRPB para ver si factores como la edad, el sexo y el consumo de cigarrillos influían en la frecuencia basal. Para ello se utilizó el análisis de la varianza de acuerdo a $2 \log lo/lm$ que corresponde a una ecuación de chi cuadrado donde:

lo = observaciones deseadas para un ajuste perfecto y lm = observaciones deseadas para un ajuste particular.

El análisis estadístico mostró que el número de dicéntricos aumenta con la edad y el consumo de cigarrillos y no presenta variación con el sexo.

Población expuesta a bajas dosis de R.I. del Servicio de Radiodiagnóstico del HGUGM

Se ha realizado un segundo estudio de frecuencia basal de aberraciones cromosómicas en individuos expuestos a radiaciones ionizantes y pertenecientes al Servicio de Radiodiagnóstico del hospital, se seleccionaron 64 individuos expuestos que en ningún caso ni de forma puntual hubiesen superado los límites de dosis establecidos.

32 mujeres y 32 varones, agrupados en intervalos de edad (mayores de 35 años y menores de 35) y en los que se ha tenido en cuenta el tiempo que llevaban trabajando expuestos a radiaciones ionizantes.

Se analizaron 500 metafases por individuo, un total de 32.000 metafases y se estimó una frecuencia de 0.00087 dic/célula.

Es decir 0.9 dicéntricos en 1.000 células analizadas, una frecuencia que está dentro de la media de resultados obtenidos en publicaciones para población control.

La frecuencia obtenida en este segundo estudio muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas con respecto a la población control.

6.3 ESTIMACIÓN DE DOSIS EN INDIVIDUOS QUE ACUDEN AL C. DE RADIOPATOLOGÍA POR SOSPECHA DE SOBREEXPOSICIÓN A R.I.

Desde el año 1989 en el que se realizó la primera dosimetría biológica, se han analizado un total de 103 individuos que han acudido al Centro de Radiopatología del HGUGM con sospecha de sobreexposición a radiaciones ionizantes.

En diciembre de 1999 se realiza el primer estudio de dosimetría biológica mediante la técnica FISH (momento en el que se dispone de las curvas de calibración necesarias para la estimación de dosis por esa técnica).

De los individuos que acudieron con sospecha de sobreexposición a RI, solamente 10 han sido positivos y solamente uno fue positivo para dosis altas, se le estimó una dosis de 1.3 Gy, los otros 9 fueron positivos para bajas dosis. El 90% restante ha sido negativo.

Si clasificamos a los individuos según su procedencia, el grupo más numeroso (37 individuos) corresponde a los que provienen de instituciones sanitarias, la mayoría de este grupo acuden al laboratorio por presentar lecturas dosimétricas elevadas., le siguen en número, el público y los procedentes de empresas de radiología industrial, siendo solamente 3 individuos los que proceden de centrales nucleares. Sin embargo, el mayor número de positivos lo presentan los trabajadores de empresas de radiología industrial 6 positivos en 21 casos, seguidos del público (solo 2 positivos), mientras que los que proceden de Instituciones sanitarias a pesar de ser el grupo más numerosos solamente hay un caso positivo en los 37 individuos analizados. Los casos procedentes de centrales nucleares han sido todos negativos.

7. ESTUDIO, MEDIANTE DOSIMETRÍA BIOLÓGICA, DE POBLACIONES SELECCIONADAS PARA DEFINIR EL IMPACTO BIOLÓGICO DE UNA SUPUESTA EXPOSICIÓN CRÓNICA A RADIACIONES IONIZANTES EN EL COLECTIVO DE TRIPULACIONES AÉREAS

Con fecha 6 de septiembre de 2004 se firmó entre la Fundación de Investigación Biomé-

dica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Iberia Líneas Aéreas de España y la Mutua Fraternidad-Muprespa un Convenio de colaboración, con la finalidad de obtener un estudio de población que permitiese determinar si existen diferencias significativas entre el personal de vuelo de largo radio (vuelos transoceánicos) de la compañía Iberia y una muestra de población control.

El interés por este estudio surge tras la publicación del Reglamento sobre protección sanitaria contra radiaciones ionizantes (R.D. 783/2001 de 6 de julio de 2001) que establece en su art. 64 que “las compañías aéreas tendrán que considerar un programa de protección radiológica cuando las exposiciones a la radiación cósmica del personal de tripulación de aviones puedan resultar en una dosis superior a 1 mSv por año oficial.”

Este reglamento contempla una serie de puntos:

- **Evaluación** de la exposición del personal implicado
- **Organización** de los planes de trabajo a fin de reducir la exposición en el caso del personal de tripulación más expuesto
- **Información** a los trabajadores implicados sobre los riesgos radiológicos asociados a su trabajo
- **Protección especial** durante el embarazo y la lactancia.

A la vista de que en los últimos años se han publicado numerosos estudios, a menudo contradictorios, sobre las consecuencias de estas exposiciones y, como indica el propio convenio, teniendo en cuenta que las tripulaciones aéreas son un grupo muy numeroso de trabajadores laboralmente expuestos a radiaciones ionizantes Iberia y la Mutua Fraternidad-Muprespa, no ajenas a esta situación, se plantean la realización de un estudio en profundidad del problema por tres motivos:

- Dejar constancia de su interés y preocupa-

ción por cualquier aspecto que guarde relación con la salud de los trabajadores.

- Disponer de datos propios, obtenidos de forma objetiva por un Organismo imparcial y solvente que le permita participar en cualquier foro en el que se plante este asunto.
- Valorar con datos adecuados la situación y comunicarla a los trabajadores afectados, adoptando si fuera el caso las medidas oportunas.

Estos motivos los llevaron a firmar un acuerdo con esta Institución, el Centro de Radiopatología y Radioprotección dependiente del Hospital General Universitario Gregorio Marañón es el único Centro de Referencia en España de Nivel II (el nivel superior se encuentra en Fonteneau aux Roses, Cedex, Francia) para atender a irradiados y contaminados, reconocido como tal por el Ministerio de Sanidad y Consumo desde 1985. Además, es el único que dispone de curvas de calibración dosis-efecto para todos los tipos de energías (rayos x, gamma y neutrones), lo que es imprescindible para poder estimar dosis de radiación en aquellos individuos que acuden con sospecha de sobreexposición a radiaciones ionizantes.

Tras la firma del Convenio, en octubre de 2004 se comenzó con el proyecto. Se desarrolló una aplicación propia para la gestión y manejo de los datos.

Se plantea un estudio poblacional comparando dos grupos.

- altura de vuelo superior a 9.000 metros. 150 personas
- personal de tierra. 100 personas

Este segundo grupo se considera imprescindible para poder disponer de la frecuencia basal de traslocaciones y dicentricos en una población de referencia. Estos datos son posteriormente asimilados por un estudio estadístico. En la experiencia del Laboratorio de Dosimetría Biológica del Hospital General

Universitario Gregorio Marañón, se dispone de un estudio de frecuencia basal en la Comunidad de Madrid y otro en personas profesionalmente expuestas a radiaciones ionizantes con fines médicos que se ha comentado en los apartados anteriores

Cada una de las propuestas conllevó **subgrupos por antigüedad:**

- Entre 5 y 10 años
- Entre 10 y 15 años
- Superior a 15 años

Los **subgrupos** se catalogaron por:

- Edad
- Sexo
- Hábitos: tabaco, alcohol, café, otros (individual o en conjunto)
- Antecedentes:
 - Patologías previas.
 - Idem. persistentes.
 - Medicación.
 - Exposiciones a RI de uso médico: frecuencia, tipo y tiempo.
 - Antecedentes familiares de línea oncológica.
 - Patologías hereditarias en descendientes.
 - Positividad de marcadores Tumorales en sangre: PSA, CEA y AFP en varones y CEA, Ca 19.9, Ca 125 Ca 15.3 en mujeres.
 - Alteraciones en el Espectro Electroforético.
 - Alergias conocidas.

Como **grupos de exclusión** se consideran:

- Los que no acepten integrarse en el estudio
- Exploraciones radiológicas en el último año (TGI, Enema Opaco, Urografía descendente, TAC toracoabdominal, Radiología intervencionista o invasiva.
- Diagnóstico previo de cáncer tratado con Quimio o Radioterapia
- Antecedentes laborales en profesiones de riesgo asociado al cáncer (madera, pinturas, minería, industria nuclear etc.)
- Consumo de sustancias tóxicas

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el colectivo de vuelo quedó de la siguiente manera:

1. Ser tripulante técnico o de cabina de pasajeros de Iberia, varón o mujer, en activo y de al menos 45 años cumplidos en la fecha de la extracción de sangre.
2. Llevar al menos 10 años de servicio continuo con programaciones completas, es decir, sin haber sido interrumpidos por desempeño de cargos en la compañía, excedencias, reducciones de vuelo por cuidado de hijos, bajas médicas o permisos superiores a 3 meses y otras causas.
3. Llevar al menos 5 años de servicio continuo en flotas de largo radio, preferentemente A-340.
4. No haber sufrido exposición a radiología médica diagnóstica o terapéutica, como por ejemplo TAC, radioterapia asociada a neoplasias y otras.

Se necesitan 150 personas. Para ello se irá modulando, como sea necesario para tener tres grupos de 50, uno entre 45-50 años, otro entre 50-55, y el tercero, de 55-60. Esto se podrá hacer a posteriori cuando se vea como van quedando los grupos. De esta forma se asegura el estudio de una población sana, homogénea en cuanto a horas de vuelo (70-85 hrs/mes los últimos años) y de ambos sexos.

El procedimiento seleccionado para garantizar el cumplimiento del objetivo del estudio, basado en la incertidumbre de la determinación de la dosis recibida hace tiempo o acumulada tras exposición crónica por un lado y en tener sensibilidad para esta determinación a baja dosis de radiación, es el estudio de traslocaciones mediante la técnica FISH que ha demostrado proporcionar una adecuada información, a través de la presencia de aberraciones cromosómicas estables derivadas de la dosis recibida hace mucho tiempo o acumulada tras exposición crónica.

A partir de enero de 2005 se comienzan a recibir las primeras muestras procedentes del Servicio Médico de Iberia. Todas ellas cumplían los requisitos establecidos en la memoria inicial (consentimiento informado del individuo objeto de estudio y datos médicos, analíticas y toda el resto de información que fuese de interés).

A la vista de los primeros resultados obtenidos, se realiza una revisión bibliográfica y se interambian opiniones con los más prestigiosos laboratorios europeos, entre ellos la National Radiological Protection Board (UK), concretamente con los Drs. Alan Edwards y David Lloyd, reconocidos a nivel mundial como expertos en el análisis de alteraciones cromosómicas producidas por radiaciones ionizantes y en su tratamiento estadístico.

De acuerdo con estos primeros análisis y valoraciones se aumenta el número de células en aquellos individuos que en las 200 primeras células analizadas se encuentre una alteración cromosómica estable (traslocación) y se amplía el estudio en esos individuos a más de 1.000 células, ajustando el número de individuos objeto de estudio, aunque se superarán al final del proyecto las 50.000 células previstas inicialmente.

7.1 RESULTADOS DEL PROYECTO

Se han recibido muestras sanguíneas correspondientes a 95 personas, 53 controles de tierra y 42 de vuelo. De estas 95 personas a 10 de ellas ha sido necesario extraerle sangre en dos ocasiones, ya que al ampliar el número de células a estudiar la muestra inicial era insuficiente, y otras 10 han sido eliminadas del estudio por encontrarse las muestras en mal estado o por presentar un escaso crecimiento celular.

Se han estudiado en 48 individuos al menos 200 células y en 23 de ellos se ha ampliado el estu-

dio a 2.000 células por presentar alguna alteración cromosómica estable en las 200 primeras (Edwards & Lloyd 2005). En estos momentos están en estudio 6 casos más teniendo un total de 53.833 células analizadas (3.833 células más de las previstas en la memoria inicial).

Los 48 individuos estudiados hasta la fecha son negativos individualmente, pues aún en los casos más desfavorables, y con un índice de anomalías mayor, la frecuencia de traslocaciones es acorde con la edad del individuo, ya que debido a su naturaleza estable, aumentan con el tiempo y en consecuencia con la edad (Lucas 2000, Whitehouse 2005 y otras).

En los 23 individuos que se han estudiado alrededor de 2.000 células se ha ido emparejando control-caso estrictamente en cuanto a la edad (Lucas 2000), intentando que en nin-

gún caso existiese una diferencia de edad de más de 5 años. La frecuencia basal obtenida hasta la fecha es más baja en la población control que en la población expuesta, el número de células analizadas también es menor en los controles que en el personal de vuelo.

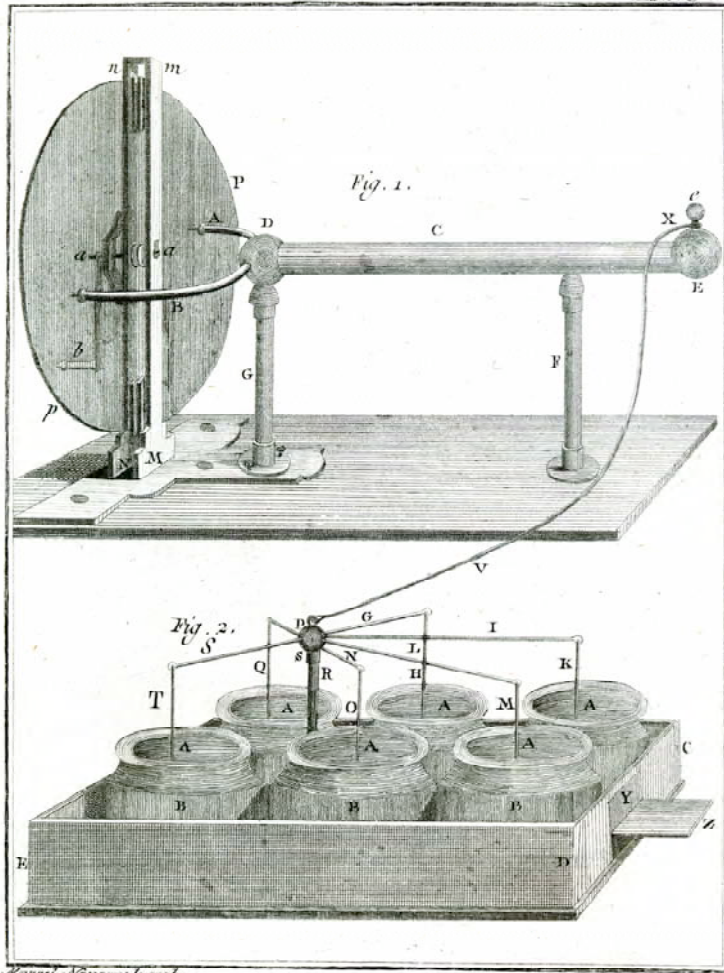
En el periodo restante de vigencia del convenio, se seguirán procesando y analizando las muestras de acuerdo con el flujo hasta ahora establecido.

Se calcula que la terminación del proyecto y, con ello, los resultados definitivos del análisis citogenético estarán disponibles unos tres meses antes de la finalización del convenio.

A partir de este momento se procederá, a la realización del análisis estadístico, la valoración y estudio de los datos y a la elaboración de las conclusiones definitivas.



DefinitelyVFR.
Don Feight.



Física. Lámina 67.
Manuel Navarro.