

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias Básicas
Escuela de Biología

Elaboración de la curva preliminar de calibración dosis-efecto utilizando el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis en el laboratorio de citogenética humana del Instituto de Investigaciones en Salud

Trabajo Final de Graduación modalidad “Práctica Dirigida” para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética Humana

Bach. Priscilla Redondo Arias
A75254

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
2020

Miembros del Tribunal

Licda. Luisa Valle Bourrouet

Directora del Trabajo Final de Graduación

M.Sc. Wendy Malespín Bendaña

Lector del Trabajo Final de Graduación

Dr. Alejandro Leal Esquivel

Lector del Trabajo Final de Graduación

Dr.rer.nat. Gabriela Chavarría Soley

Miembro del Tribunal

Dr. Federico Muñoz Rojas

Decano a.i

Presidente del Tribunal

Bach. Priscilla Redondo Arias

Postulante

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

21 de julio de 2020

DEDICATORIA

A mi madre quien me dio la vida, me enseñó tanto, me ayudó y escuchó en los momentos más difíciles y quien también compartió conmigo tantos acontecimientos en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mi familia por ayudarme en este caminar continuo.

A Luisa por tanto que compartimos y por todo lo que aprendí a su lado, de la vida y del laboratorio. A Wendy Malespín y a Alejandro Leal por su apoyo y aportes brindados durante este camino.

A todos los compañeros del INISA por todas las enseñanzas y tanta ayuda especialmente a Nelson Brenes, Fernando Ortiz, Rodolfo Hernández y Olman Chanto. A Ronald Carrillo, Marvin Rodríguez y Alejandra Vargas por su colaboración en este proceso.

A los profesores de la Escuela de Biología de los que tanto aprendí todos estos años y por toda su ayuda, especialmente a Alfredo Cascante, Gerardo Umaña, Jeffrey Sibaja, José Vargas, James Karkashian y Elmer García.

A Lynneth Chaves y Laura Stiller por su profesionalismo y apoyo oportuno en mi vida.

Índice

Miembros del Tribunal.....	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
Índice.....	5
Lista de abreviaturas utilizadas.....	6
Lista de figuras y cuadros.....	6
Resumen	7
ANTECEDENTES	8
1.1 Marco teórico.....	8
1.1.1 Cromosomopatías y MN como biomarcador asociado a la RI.....	8
1.1.2 RI, sus efectos y la curva de calibración dosis-efecto para MN	13
1.2 Justificación	16
1.3 Contribución científica	18
1.4 Objetivos.....	19
1.4.1 Objetivo general.....	19
1.4.2 Objetivo específico	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
1. Toma de las muestras e irradiaciones realizadas	20
2. Protocolo para la prueba de micronúcleos	21
3. Análisis estadístico.....	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	36
REFERENCIAS	37
ANEXO 1	43
ANEXO 2.....	45

Lista de abreviaturas utilizadas

BN: binucleadas

CD: cromosomas dicéntricos

DB: dosimetría biológica

Gy: Gray

HSJD: Hospital San Juan de Dios

MN: micronúcleo (s)

CBMN: micronúcleos con bloqueo de la citocinesis

OIEA: Organismo Internacional de Energía Atómica

RI: radiación (es) ionizante (s)

Lista de figuras y cuadros

Fig. 1	11
Fig. 2	12
Fig. 3	15
Fig. 4	24
Fig. 5	29
Fig. 6	30
Fig. 7	31
Cuadro 1	12
Cuadro 2	20
Cuadro 3	25
Cuadro 4	27
Cuadro 5	28

Resumen: La dosimetría biológica (DB) consiste en una serie de técnicas en las que se utilizan biomarcadores asociados a los efectos de las radiaciones ionizantes (RI) como los micronúcleos (MN), que son de gran utilidad para evaluar si una persona está sobreirradiada, ya que permiten hacer un cálculo aproximado de la dosis absorbida. Esta práctica tuvo como objetivo la elaboración de una curva preliminar de calibración dosis-efecto para rayos gamma utilizando el ensayo de MN. Esta primera etapa es la base para la curva de calibración del Servicio de DB del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA). Entre el 2018 y el 2019 se realizaron las siguientes actividades: 1) la irradiación in vitro (con una fuente de Cobalto-60; ^{60}Co) de rayos gamma en el Servicio de Radioterapia del Hospital San Juan de Dios (HSJD)) de nueve muestras de sangre periférica de una voluntaria femenina, en nueve puntos de dosis distintos (0.3 Gray (Gy), 0.5 Gy, 1Gy, 1.5 Gy, 2 Gy, 2.5 Gy, 3 Gy y 4 Gy) en las que se incluye (0 Gy) como control para evaluar el basal de la donante; 2) el cultivo de linfocitos de la sangre irradiada utilizando el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) y la preparación de extensiones celulares incluyendo la tinción; y 3) el análisis de MN utilizando un microscopio de luz. Estas dos últimas actividades se realizaron en los laboratorios de citogenética del INISA. Para la elaboración de la curva se analizaron 2000 células binucleadas (BN) para las cuatro primeras dosis y 1000 células BN para los otros cinco puntos de dosis para un total de 13000 células BN. Posteriormente, con los datos resultantes del conteo de células BN y MN por dosis, se utilizó el software Dose Estimate para obtener la curva de calibración dosis-efecto. La curva resultante tuvo un ajuste lineal-cuadrático según lo esperado (a mayor dosis, mayor frecuencia de MN) $Y = 0.0081 (+/-0.0037) + 0.0026 (+/- 0.0085) D + 0.0076 (+/- 0.0029)D^2$; $X^2 = 27.5900$; gl. = 6; $p = 0.6667$; valores p para los coeficientes (z-test): $p_A = 0.0732$, $p_\alpha = 0.7716$ $p_\beta = 0.0411$.

La curva de calibración obtenida es un valioso trabajo preliminar, que se espera continuar en el INISA con la incorporación de mayor cantidad y variedad de donantes, mejorando la técnica de tinción para la lectura de los micronúcleos.

ANTECEDENTES

1.1 Marco teórico

La citogenética es la rama de la genética que estudia la estructura, función y evolución de los cromosomas y su efecto en el fenotipo. En esta área se utilizan distintas técnicas convencionales y moleculares (Martínez-Fernández *et al.*, 2010). La dosimetría biológica (DB) es un método de evaluación de la dosis de irradiación mediante la cual se puede observar el síntoma o fenómeno que aparece después de la irradiación y que también permite medir los cambios físicos, químicos y biológicos ocasionados, así como los daños causados en las células, los órganos y el cuerpo por la radiación ionizante (RI) absorbida (SENUBIO/Isirum, 2006; Gotoh, 2012; Di Giorgio, 2017). La DB utiliza biodosímetros clínicos, bioquímicos, hematológicos y citogenéticos. Las técnicas citogenéticas son las más recomendadas por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), como por ejemplo las pruebas de micronúcleos (MN) (OIEA, 2014). Uno de los biodosímetros citogenéticos más utilizado es el ensayo de cromosomas dicéntricos (CD) que es conocido como el estándar de oro en la DB, ya que es altamente sensible y relativamente específico a la irradiación (Agrawala *et al.*, 2010; Castro-Volio, 2013; Wong *et al.*, 2013; Syaifudin *et al.*, 2017).

La dosimetría citogenética, mediante el análisis de aberraciones cromosómicas y celulares inducidas por la RI, es un método de estimación de dosis muy útil en casos donde las personas expuestas a irradiaciones no han utilizado el equipo dosimétrico adecuado como un dosímetro personal de bolsillo (Gotoh, 2012). Por tanto, es una fuente de información importante en la investigación de emergencias radiológicas (Lee, 2011; Syaifudin *et al.*, 2017).

1.1.1 Cromosomopatías y MN como biomarcador asociado a la RI

El análisis de las aberraciones cromosómicas en las células que han sido irradiadas, es un procedimiento de mucha utilidad para estimar la dosis de irradiación recibida que permita al médico tratar adecuadamente al paciente que ha sufrido una sobreexposición. Entre los efectos de la RI en el material genético están las rupturas de doble banda, que son las que inducen la formación de aberraciones cromosómicas estructurales (Martin *et al.*,

2007; Syaifudin *et al.*, 2017). Una alteración grave en un cromosoma ocasiona problemas a la célula en el momento de la división celular. Las aberraciones cromosómicas como los cromosomas dicéntricos, anillos y fragmentos acéntricos son inestables porque se pierden en las divisiones celulares sucesivas. Este tipo de cromosomopatías se utilizan para estimar las dosis de irradiación tras exposiciones agudas. En cambio, las inversiones y las translocaciones, por ser transmisibles a las células hijas, son estables y a causa de esta estabilidad pueden ser indicadores de exposiciones antiguas o crónicas (Di Giorgio *et al.*, 2003; Castro-Volio, 2013).

Específicamente, el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN), utilizado en este proyecto, se basa en la expresión de MN en linfocitos de sangre periférica que completan su división celular *in vitro*. Con la adición de un inhibidor de la citocinesis, la citocalasina B, las células BN se acumulan y se distinguen al mostrar MN que se pueden contar. Esta prueba es el método estándar de evaluación de los MN en linfocitos cultivados (OIEA, 2014).

El ensayo de CBMN es un sistema integral para evaluar el daño al ADN mediante el análisis de células binucleadas (BN), MN, puentes nucleoplásmicos y yemas nucleares; también a través de la citostasis vía la proporción de células mono-, bi- o multinucleadas; y mediante la citotoxicidad por medio de las proporciones de células necróticas y apoptóticas (Fenech, 2007). El ensayo de CBMN tiene varias ventajas con respecto a otros ensayos de DB, ya que es más rápido y puede aplicarse para monitorear poblaciones grandes, además de que requiere de menos especialización y capacitación por parte del analista. Sin embargo, es menos específico que otros ensayos como el de CD porque los MN pueden ser causados por varios agentes y no solo por la RI (Castro-Volio, 2013; Syaifudin *et al.*, 2017).

La técnica de micronúcleos (MN) funciona como un indicador biológico para identificar el grado de exposición a la RI en humanos. Los MN se forman en anafase cuando se quedan rezagados fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros (evento clastogénico o evento aneugénico, respectivamente) que no pasan a los núcleos de las células hijas porque no se pudieron sujetar al huso mitótico durante la metafase y que se observan en el interior del citoplasma como pequeños objetos esféricos que presentan las mismas propiedades morfológicas y de tinción que los núcleos (Zalacain, Sierrasesúmaga,

& Patiño, 2005; Di Giorgio *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004; Thierens & Vral, 2009; OIEA, 2014; Terradas, Martín, Tusell, & Genescà, 2010). Los MN inducidos por la RI representan fragmentos acéntricos producto de cromosomas que se fracturan (Castro-Volio, 2013; Fenech, 2010; Vral *et al.*, 2011). Además de la RI, los MN pueden ser inducidos por una serie de clastógenos como la nicotina, pesticidas, agroquímicos y otros agentes químicos (Castro-Volio, 2013; Ramírez & Cuenca, 2001; Castro *et al.*, 2004; Fenech, 2007) por lo que el uso de MN provee una técnica aplicable a estudios de toxicología genética para analizar el daño al ADN.

La formación de MN está estrechamente relacionada con la tasa de dosis de RI y con la capacidad de reparación celular y reparación del ADN (Syaifudin *et al.*, 2017). A pesar de que los MN desaparecen con una vida media de alrededor de un año, y aunque no son específicos de la exposición a radiaciones, han sido utilizados en varias investigaciones para determinar la dosis de irradiación durante radioterapia o accidentes radiológicos (Syaifudin *et al.*, 2017). A mayor dosis de RI, se espera mayor cantidad de MN (OIEA, 2014). De esta manera, calcular la frecuencia de MN es un método útil para evaluar el daño en eventos masivos fortuitos (Syaifudin *et al.*, 2017).

Desde el punto de vista molecular, los MN están altamente relacionados con rupturas de doble banda (DSB), aunque no se sabe bien si estos daños generan mecanismos de reparación ya que algunos de estos factores no han sido detectados dentro de los MN (Terradas, Martín, Tusell, & Genescà, 2009). Siguiendo con los aportes de estos autores, ellos mencionan que las DSB inducidas por irradiación generan una modificación en las proteínas estructurales de la cromatina como la histona H2AX que se fosforila rápidamente en el sitio de quiebre. Además, Terradas *et al.* (2009) detallan que solo una pequeña cantidad de las DSB de los MN son capaces de reclutar adecuadamente a 53BP1 (la proteína de unión a P53 1 (53BP1) y MRE11 (la proteína de recombinación meiótica 11); de (MRE11). De esta manera, ellos concluyen que los MN portadores de DSB no reparadas son conducidos a la eliminación, lo que favorece la inestabilidad cromosómica en términos de pérdida de alelos. Las DSB son reparadas por los mecanismos de recombinación homóloga o por la unión de extremos no homólogos (Sancar, Lindsey-Boltz, Ünsal-Kaçmaz, & Linn, 2004; Fenech, 2010) (Fig. 1). Además, Orthwein *et al.* (2014) mencionan en su estudio que la razón por la que las DSB no se reparan puede deberse al hecho de que

este proceso está inactivado para evitar la fusión de los telómeros mitóticos desprotegidos en metafase.

El ensayo de MN es sensible a la mala reparación de las rupturas en doble banda del ADN

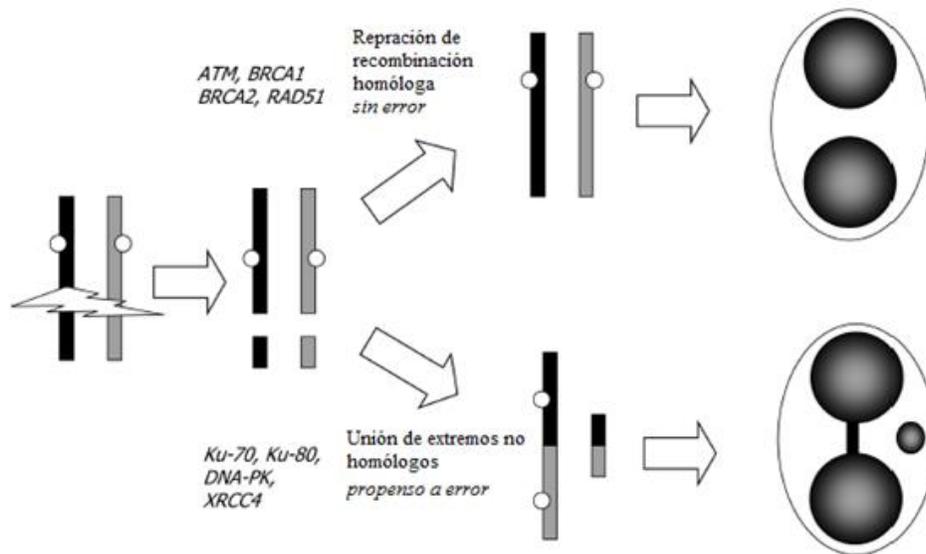


Fig. 1. Rupturas en doble banda (DSB) y proceso de formación de MN debido a RI. Cuando hay defectos en los genes involucrados en la reparación de la recombinación homóloga (*ATM, BRCA1, BRCA2, RAD51*) la célula utilizará el mecanismo de reparación de unión de extremos no homólogos propenso a error; esto genera una mala reparación de las rupturas en doble banda del ADN, formación de cromosomas dicéntricos y fragmentos acéntricos que son detectados como puentes nucleoplásmicos y MN (modificado de Fenech, 2010).

Por otra parte, un aspecto importante para utilizar los MN como un biomarcador es su análisis. Para evaluar los MN en el microscopio se toman en cuenta varios criterios de evaluación que permiten al analista discriminar lo que cuenta o no como MN para unificar el proceso y evitar más sesgos entre los diversos colaboradores del laboratorio. El Cuadro 1 (Fenech *et al.*, 2003; ISO: 17099, 2014) muestra los criterios que el analista utiliza para contabilizar la cantidad de MN y células BN mientras observa las láminas al microscopio de luz. La Fig. 2 muestra ejemplos de MN y células BN que cumplen estos criterios (Fenech *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Criterios de evaluación para el conteo de MN y células BN*

MN	Células BN
El diámetro debe oscilar entre 1/16-1/3 de la media del diámetro del núcleo principal.	El citoplasma debe distinguirse claramente.
No deben ser refractarios.	Las membranas citoplasmática y nucleares deben estar intactas.
La intensidad de la tinción debe ser similar a los núcleos principales.	Los núcleos deben tener igual tamaño, forma y patrón de tinción.
Deben tener forma similar a los núcleos de la célula BN.	Los núcleos pueden estar unidos por puentes nucleoplásmicos.
No deben estar conectados con ninguno de los núcleos de la célula BN.	Los núcleos pueden tocarse pero no traslaparse.
Pueden tocar los núcleos de la célula BN pero no traslaparse con ellos.	Ninguno de los núcleos debe encontrarse en etapas de apoptosis.

*Adaptado de: Fenech *et al.* (2003); ISO: 17099 (2014)

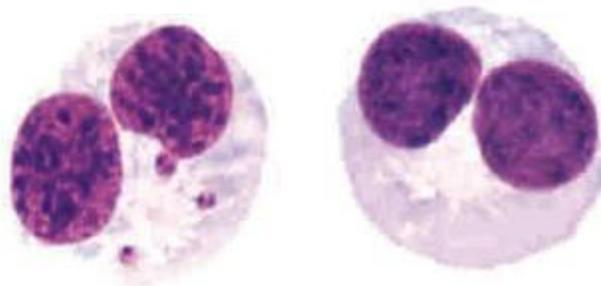


Fig. 2: Ejemplos de MN y células BN que se pueden observar en una lámina con extensiones celulares (Fenech *et al.*, 2003).

Por último, es importante mencionar que la técnica de MN, o su análisis estadístico, ha sido ampliamente utilizada en otros países como Argentina, Cuba, EE. UU., Italia, Australia, Turquía, Filipinas y España en el campo de la toxicología genética y en trabajos

de cooperación inter-laboratorista (Akyıl, 2016; Fenech *et al.*, 2016; Olivo, 2016; Bolognesi *et al.*, 2017; Khanal *et al.*, 2018). En Costa Rica esta técnica fue aplicada, tanto con linfocitos como con el epitelio oral estudiando células binucleadas hasta mononucleadas con variantes específicas, en mujeres expuestas a plaguicidas para comparar con el grupo control (mujeres sin exposición a plaguicidas) la frecuencia de MN (Ramírez & Cuenca, 2001; Castro *et al.*, 2004). Sin embargo, en relación con el daño genético inducido por RI, hasta el momento no hay reportes de estudios realizados en Costa Rica que utilicen esta técnica pues no se contaba, como hasta muy recientemente, con un laboratorio especializado de DB que brindara la seguridad y protección radiológica apropiadas (Castro-Volio, 2013).

1.1.2 RI, sus efectos y la curva de calibración dosis-efecto para MN

Hay varios tipos de RI como lo son las partículas α , β y de neutrones así como los rayos gamma y los rayos X (Mirion Technologies, 2015; CSN, 2015). Las radiaciones α tienen mucha masa pero son poco penetrantes por lo que la piel nos protege de sus efectos. Las radiaciones β tienen menos masa que las α pero son más penetrantes que ellas ya que traspasan 1 o 2 cm de tejido vivo. Los rayos X y gamma son radiaciones electromagnéticas sin carga ni masa pero son bastante penetrantes y para frenarlas se necesita una lámina de plomo gruesa. Los gamma se pueden trasladar por aire mucho más lejos que las radiaciones α y β . Los rayos X son de menor energía y de una longitud de onda mayor que los rayos gamma. Por último, los neutrones son muy penetrantes al no tener carga eléctrica pueden dividir la estructura de ciertos átomos por lo que son el único tipo de radiación capaz de volver radioactivos otros materiales. Los neutrones se pueden trasladar a través del aire por cientos hasta miles de metros pero se pueden detener con el agua o el concreto (Mirion Technologies, 2015; CSN, 2015).

Cuando la radiación de partículas cargadas atraviesa el tejido biológico que tiene mucha agua, la ionización de esta produce radicales libres que alteran las moléculas de los tejidos como el ADN y conduce al desarrollo anormal de las células (CSN, 2015). Los efectos biológicos de las RI se clasifican como estocásticos cuando son graves y equivalen a un evento fatal cuya probabilidad de ocurrencia aumenta con la dosis o como determinísticos cuando su frecuencia y gravedad aumenta con la dosis de radiación que ha

provocado un efecto en por lo menos 1 % a 5 % de los individuos expuestos, es decir, una sobreexposición que supera este umbral y que puede ser externa, interna, instantánea, prolongada, en todo cuerpo o en una parte de él (Cascón, 2009). El tiempo necesario para que un efecto se manifieste se denomina período de latencia y este puede ser de horas, días o semanas para los efectos tempranos o de meses o años para los efectos tardíos (Cascón, 2009). Según la OIEA (1999), las dosis de radiación terapéuticas dañan células sanas porque deben ser bastante elevadas y tóxicas para destruir también las malignas ya que si se administran dosis menos severas para producir menos complicaciones pues también se disminuirá el éxito de curaciones con este método.

La radiación gamma, que presenta una transferencia lineal de energía (TLE) baja o escasa densidad de ionización, produce una distribución del daño que se ajusta a una distribución de Poisson (OIEA, 2014; Rastkhah *et al.*, 2015). TLE es una expresión comparativa útil para describir la deposición de energía por diferentes tipos de radiación y, en este caso, la RI de TLE baja de una dosis particular se distribuirá aleatoriamente entre las células por la elevada cantidad de trayectorias (OIEA, 2014).

La dosimetría citogenética permite estimar la dosis recibida por una persona expuesta accidentalmente a RI al comparar la cantidad de aberraciones observadas como los MN con una curva de calibración dosis-respuesta realizada *in vitro*. Para esto se requiere que el parámetro medido posea una relación dosis-efecto perdurable, reproducible y de alta especificidad respecto a las radiaciones (Terzoudi & Pantelias, 2006; Lamadrid-Boada *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2013; Syaifudin *et al.*, 2017). Una curva de calibración dosis-efecto para MN se ajusta a un modelo lineal-cuadrático: $Y = C + \alpha D + \beta D^2$, donde Y es la frecuencia de MN, D es la dosis de irradiación en Gray (Gy), C es el valor control o basal y α y β son los coeficientes lineal y cuadrático respectivamente con 95% de confianza (Rastkhah *et al.*, 2015). Respecto a la ecuación, cabe mencionar que el coeficiente lineal indica que una trayectoria de RI produjo dos lesiones y el cuadrático, por su parte, indica que las dos lesiones fueron provocadas por dos trayectorias distintas (Carbajal, 2012). Las curvas de calibración (Fig. 3) se usan como herramienta biodosimétrica para la clasificación de personas accidentalmente expuestas a RI y para un biomonitoreo a gran escala de trabajadores expuestos ocupacionalmente a dosis acumuladas (Pejchal *et al.*, 2011; Rastkhah *et al.*, 2015).

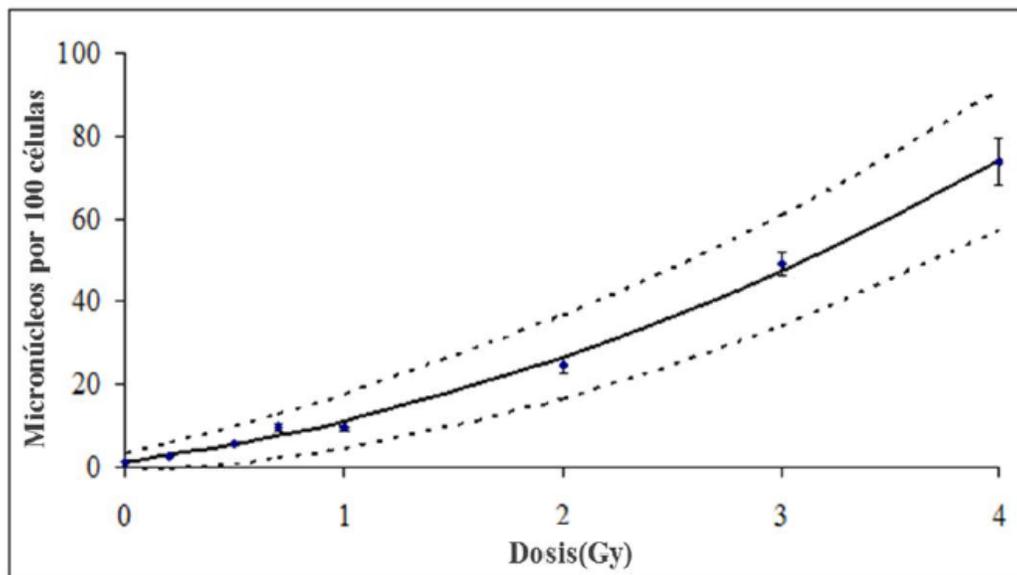


Fig. 3: Ejemplo típico de curva de calibración dosis-efecto para MN con una fuente de ^{60}Co de rayos gamma, tasa de dosis de 0.5 Gy/min). Línea continua: datos de 47 donantes y líneas discontinuas: intervalos de confianza superior e inferior al 95 % (modificado de OIEA, 2014).

La recomendación del OIEA (2014), mencionada también en el documento de ISO: 17099 (2014), es que cada laboratorio obtenga sus propios datos y elabore su propia curva de calibración dosis-efecto. Esto se debe a que siguen habiendo diferencias entre laboratorios por el uso de diferentes protocolos o criterios de evaluación (Pejchal *et al.*, 2011; Antunes *et al.*, 2014; Rastkhah *et al.*, 2015) lo que aumenta la incertidumbre al interpretar las dosis utilizando una curva obtenida en otro lugar. La variación entre individuos en la irradiación que induce la frecuencia de MN es un factor potencialmente confuso en la estimación de la dosis si la curva de calibración no es representativa de la susceptibilidad de la población en general (Fenech, 2010; Bolognesi, 2011).

Para la elaboración de la curva se deben incluir varios procesos como someter a los linfocitos (células T) de la sangre periférica de distintos donantes a radiaciones *in vitro* a diferentes dosis para conocer el efecto que la RI tiene sobre estas células (Lee, 2011). Se sabe que distintos factores en los donantes afectan la frecuencia de MN tales como la edad, el sexo, la dieta y los hábitos o la exposición a agentes químicos (Fenech & Bonassi, 2011; Zalacain *et al.*, 2005). De esta manera, para elaborar una curva de calibración dosis-efecto

se debe incluir una variedad de donantes, tanto en número como en características específicas. Además, varios miembros del laboratorio deben participar en el análisis de las muestras de sangre irradiada para robustecer los datos. Por estas razones y según el criterio de una experta que labora en la Autoridad Regulatoria Nuclear de Argentina, la elaboración de la curva es un proceso que puede llevar varios años pues debe permitir la incorporación de datos de distintos donantes (Di Giorgio, comunicación personal, 22 de mayo de 2018).

La selección del rango de las dosis utilizadas para la curva de calibración depende de la calidad de la irradiación. En este caso para la radiación gamma, que es de TLE baja, es necesario seleccionar más de siete dosis (ISO: 17099, 2014). Según este mismo documento, las dosis típicas para este tipo de energía son de 0 Gy a 0.5 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy y 4 Gy. De esta manera, las dosis utilizadas para la elaboración de esta curva preliminar se encuentran dentro de lo establecido por las normas internacionales.

1.2 Justificación

La DB surge en el marco de los accidentes radiológicos y nucleares y hoy forma parte de la protección radiológica de muchos países, ya que las tecnologías que utilizan RI van en aumento en el mundo y nuestro país no es la excepción. Además, se debe tomar en cuenta que los accidentes radiológicos pueden suceder en cualquier momento y que en la región centroamericana no existen laboratorios de DB. Por lo tanto, el servicio de DB que se estableció en diciembre de 2019, al elaborar la primera curva de calibración dosis efecto para rayos gamma con el ensayo de CD, el INISA representa el primer laboratorio de este tipo en Costa Rica que esté en capacidad de brindar el servicio, no solo en casos de emergencias por accidentes radiológicos, sino que también apoyará a los trabajadores ocupacionalmente expuestos a las RI, así como a los pacientes de los que se sospeche hayan sufrido sobreirradiación.

Hace 24 años, en Costa Rica aconteció una emergencia por sobreirradiación en la que debido a un error humano, muchos pacientes se vieron afectados e incluso hubo fallecidos (La Nación, 1996, 2016). El accidente se produjo por un error de cálculo en la tasa de la dosis al calibrar la nueva fuente radiactiva después de haberla cambiado por lo que se le administró a los pacientes una radiación muy superior a la que necesitaban (OIEA, 1999). En este accidente radiológico en el país, 42 pacientes fallecieron y de los cuales tres

casos tienen como causa principal de la muerte la radiación recibida y en cuatro casos, de los 42 en total, la radiación fue un factor importante que contribuyó a la muerte (OIEA, 1999). Es posible que con la ayuda de un laboratorio especializado en dosimetría, el país hubiera tenido la capacidad de enfrentar la emergencia con las técnicas de MN o CD, a pesar de que en aquel tiempo no se hubiera contado con el equipo automatizado con el que hoy se dispone. De esta manera, un laboratorio especializado en dosimetría hubiera aportado un diagnóstico más oportuno y preciso acerca de las sobreirradiaciones de los pacientes en ese accidente para que los médicos tratantes pudieran actuar a la brevedad posible según las altas dosis recibidas.

Además, recientemente en el país se presentó un caso de una paciente que recibió el tratamiento de radioterapia en el Hospital México en 2016 y que falleció a finales del 2017 por aparentes efectos de sobreirradiación (La Nación, 2018a, 2018b). De esta manera, si en el futuro sucediera un accidente radiológico, tanto en Costa Rica como en Centroamérica, el INISA ya cuenta con un microscopio automatizado con software especializado en la captura de imágenes, conteo y análisis de MN, además el Instituto cuenta con personal capacitado en el análisis de MN y otros biomarcadores. Con este equipo automatizado, ellos han elaborado la curva calibración para rayos gamma con el ensayo de CD. El hecho de que ya el INISA cuente con esta otra curva, y tenga otras como la de MN y CD para rayos X en proyectos de futuro cercano, es de gran avance en la región ya que es la base y el precedente de la experiencia que permite a otros países aprender y colaborar en una eventual emergencia radiológica. De esta manera, el uso de estas curvas, el equipo automatizado y los trabajadores experimentados del laboratorio son de gran importancia para el país ante un accidente radiológico ya que permite apoyar sustancialmente en este tema a los médicos tratantes para que los afectados tengan un mejor diagnóstico y tratamiento.

Es importante aclarar que el Laboratorio de Citogenética del INISA para brindar el servicio de dosimetría biológica requiere elaborar curvas dosis-efecto utilizando el ensayo de CBMN con un rango de puntos de dosis de 0 a 4 Gy, con un mínimo de seis voluntarios y con diferentes tipos de energía como los rayos gamma y rayos X. La técnica de MN en células BN es muy importante para estimar la dosis recibida de las personas que se sospecha o se determina que están sobreirradiadas, especialmente si hay víctimas múltiples,

por ser una técnica donde el análisis es menos complejo que el conteo de otros biomarcadores como los CD.

Además, es oportuno mencionar que esta curva preliminar de calibración dosis-efecto de MN solo cuenta con los datos una voluntaria por lo que el mayor aporte de este trabajo es haber servido de ensayo piloto. Este trabajo da las pautas para continuar y las recomendaciones que permiten hacer mejoras técnicas para elaborar posteriormente una curva robusta que incluya mayor cantidad y variedad (edad, sexo y estilo de vida) de donantes. Por ejemplo, la curva de la Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN) de Argentina, considerada la más robusta de Latinoamérica, se ha sido robusteciendo en un período de más de 20 años y cuenta con datos de gran cantidad de voluntarios (Di Giorgio, comunicación personal, 22 de mayo de 2018); como se indicó anteriormente, una curva de calibración de dosis-efecto requiere de variedad de donantes tanto en número como características específicas. Aclaro que, en el futuro, los datos de nuevos voluntarios que formarán parte de la curva de calibración serán analizados por los técnicos e investigadores del servicio de dosimetría del Laboratorio de Citogenética del INISA; ellos serán los responsables de elaborar la versión final de la curva de calibración dosis-efecto para el biomarcador de MN. Además, estos analistas evaluarán el proceso de la realización de esta curva preliminar ya que el material de cada punto de dosis debe ser analizado por al menos un miembro del equipo del laboratorio para robustecer el análisis.

El Laboratorio de Citogenética del INISA actualmente es parte de la Red Latinoamericana de Dosimetría Biológica (LBDNet) que cuenta con un grupo de especialistas en DB de gran trayectoria y que se han comprometido con el proceso de implementación de las diferentes técnicas biodosimétricas en un servicio de DB para el país y la región. De ahí la importancia práctica de este trabajo ya que se elaboró una curva preliminar de calibración dosis-efecto para MN tan necesaria para la ejecución de esta técnica en el servicio de DB del INISA.

1.3 Contribución científica

La relevancia de esta práctica radica en la aplicación de una de las técnicas dosimétricas nuevas que se están desarrollando en Costa Rica. La elaboración de la curva preliminar de calibración utilizando el ensayo de CBMN con nueve puntos de dosis para la

primera donante femenina, sana y joven, se considera un trabajo pionero en el país y los datos fueron recopilados con el objetivo de contribuir a la elaboración de la curva de calibración de MN del INISA. En principio, esto se hizo para elaborar una curva de rayos gamma pero los hallazgos de este trabajo respecto a la implementación y a las sugerencias de mejoramiento de la técnica también serán útiles para elaborar la curva de MN para rayos X. Además, este trabajo permite a mediano plazo el desarrollo de la técnica de CBMN, una técnica dosimétrica básica que deber ser implementada por el INISA para brindar el servicio de DB en el país. Esto se suma a la técnica de CD que fue concluida y validada en agosto de 2019 y evaluada por un experto técnico del OIEA en diciembre de 2019 quien dio su aval para iniciar con el servicio de DB en el INISA a partir de enero del presente año para casos de sobreirradiación de rayos gamma y energías similares.

Asimismo, desde el punto de vista profesional, este es un nuevo campo de especialización para el biólogo costarricense que puede despertar el interés en los futuros profesionales de este ámbito científico. Además, este enfoque permite fortalecer otros conocimientos en el campo de la citogenética humana y brinda aportes en temas como la implementación de la curva de calibración dosis-efecto para MN en el INISA tanto para rayos gamma como para rayos X. Además, el uso de este biomarcador y las técnicas de este campo se pueden utilizar en otros estudios toxicológicos para estudiar el efecto genotóxico de los plaguicidas o el consumo del tabaco, entre otros.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general: Aplicar el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) para elaborar una curva preliminar de calibración dosis-efecto que se utilizará en el servicio de dosimetría biológica del laboratorio de citogenética del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA).

1.4.2 Objetivo específico: Determinar la frecuencia de micronúcleos (MN) en sangre periférica irradiada *in vitro* con rayos gamma en nueve dosis (0 Gy, 0.3 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy, 1.5 Gy, 2 Gy, 2.5 Gy, 3 Gy y 4 Gy) para la elaboración de la curva preliminar de calibración dosis-efecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Toma de las muestras e irradiaciones realizadas

El proceso práctico de este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Citogenética Humana y en el cuarto de microscopios del INISA de la UCR, entre los meses de diciembre de 2018 a marzo de 2020. En el laboratorio se tomaron las nueve muestras de sangre, una muestra por cada punto de dosis (0 Gy, 0.3 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy, 1.5 Gy, 2 Gy, 2.5 Gy, 3 Gy y 4 Gy). Las muestras de sangre, aproximadamente 4 mL, se tomaron del brazo de la donante voluntaria, en tubos Vacutainer con heparina de litio, dos para cada sesión de irradiación. En total se realizaron cuatro eventos de irradiación en los que se llevaron dos muestras de sangre. Después de la irradiación, los tubos Vacutainer se dejaron en incubación en un baño maría a 37 °C por 2 h para que entraran en acción los mecanismos de reparación.

Se realizó el procedimiento de irradiación de muestras de sangre *in vitro* con la colaboración del físico médico M.Sc. Marvin Rodríguez del Servicio de Radioterapia del Hospital San Juan de Dios (HSJD) entre diciembre del 2018 y enero del 2019 con una fuente ^{60}Co de rayos gamma (Theratron 80) a una distancia de la fuente a la superficie del fantoma de 80 cm, campos de irradiación de 10 x 10 cm² y con una tasa de irradiación específica para cada fecha (Cuadro 2), utilizando un maniquí de agua (T41023 - PTW) donado por el OIEA que se validó con estas irradiaciones y otras posteriores con el trabajo del físico Bach. Ronald Carrillo de la Escuela de Física de la Universidad de Costa Rica.

Cuadro 2. Tasa de dosis por fecha de irradiación con una fuente ^{60}Co de rayos gamma (Theratron 80) en el HSJD

Fecha de irradiación	Tasa de dosis (cGy/min)
10-dic-18	140.4
11-dic-18	140.3
15-ene-19	138.6
29-ene-19	137.9

Según el OIEA (2014), un fantoma o maniquí es un dispositivo que absorbe y dispersa la radiación gamma y X aproximadamente igual que lo hacen los tejidos del cuerpo. Está construido de PMMA, un material especializado para irradiar las muestras de

sangre ya que tiene una densidad atómica similar a la del agua y, que además, se llena con agua a una temperatura de 37 °C para estabilizar el medio simulando el cuerpo humano. Se utilizaron los protocolos descritos en el manual del OIEA (2014) y los estandarizados para su uso en el Laboratorio de Citogenética Humana del INISA. Es importante aclarar que no se tomaron muestras de pacientes para la práctica de esta técnica. La donante es joven (29 años), sana, no fumadora y de hábitos alimenticios saludables. La sangre que se irradió *in vitro* se utilizó como patrón para la elaboración de la curva preliminar de calibración dosis-efecto y no para hacer estudios de salud de la donante (Anexo 2).

2. Protocolo para la prueba de micronúcleos (adaptado de OIEA, 2014)

A) Al llegar las muestras irradiadas al INISA, se recodificaron para evitar el sesgo desde el inicio. La recodificación la realizó la encargada del proyecto, la Lic. Luisa Valle quien utilizó las letras del abecedario (A-C, E-I, Z) según llegaban las muestras. Seguidamente, se inició con el procedimiento de la siembra en la cabina de seguridad biológica clase II, A2 (Thermo Electron Corporation). Se alicuotaron 5 mL de medio de cultivo (PB-MAX™ Karyotyping Medium, Gibco) en cuatro tubos cónicos estériles de 15 mL y en cada uno se agregó 500 µL de sangre entera. Después se colocó un cultivo de cada dosis en una incubadora de CO₂ y los otros dos tubos en otra incubadora de CO₂ (Midi 40, Thermo Scientific) a 37°C en una gradilla a un ángulo de 45° para permitir el intercambio gaseoso y los tubos con las tapas bien cerradas.

B) A las 24 h de colocados los tubos en las incubadoras, se agregó a cada tubo, dentro de la cabina de flujo laminar, 20 µL de citocalasina B (5 mg Cyt-B en 3.3 mL de DMSO, a una concentración de 1.5 mg/mL con una concentración en volumen final de 6 µg/mL).

C) A las 72 h de iniciado el cultivo, se continuó con el procedimiento de cosecha. Esta inició al sacar los tubos de las incubadoras y centrifugarlos a 1200 rpm durante 10 min. Al concluir este paso, se descartó el sobrenadante de los tubos hasta dejar el botón celular con una pequeña cantidad del líquido (hasta donde comienza la punta del tubo cónico). Se resuspendió suavemente con la mano el contenido del tubo.

D) Se agregaron 7 mL de KCl 0.075 mol/L frío para lisar los eritrocitos (choque hipotónico), inmediatamente después se volvió a centrifugar a 1200 rpm durante 10 min.

E) Terminada esta segunda centrifugación, se eliminó nuevamente el sobrenadante y se resuspendió el contenido de la misma manera.

F) Se agregaron 5 mL de una mezcla de 50 mL de solución Ringer (4.5 g NaCl, 0.21 g KCl, 0.12 g CaCl₂ en 500 mL de dH₂O) y 50 mL de fijador 9:1 (metanol: ácido acético). Esto se realizó mientras se mantenía el tubo en un vórtex (Fisher Scientific) a 800 rpm durante 1 min. Inmediatamente, los tubos se pusieron a centrifugar siguiendo la descripción mencionada en el paso C.

G) Al finalizar este procedimiento, se descartó el sobrenadante, se resuspendió y se agregó solamente fijador 9:1 hasta llevar los tubos a 10 mL.

H) Este paso se repitió por lo menos tres veces hasta que el botón celular quedara blanquecino.

I) Al conseguir un botón claro, se descartó el sobrenadante hasta tener una cantidad de líquido aproximadamente el doble del tamaño del botón. Se resuspendió el botón celular frotando suavemente la punta del tubo cónico.

J) Se inició el procedimiento de la preparación de láminas en donde se limpiaron los portaobjetos con metanol frío, se secaron con papel toalla y se vertieron dos o tres gotas de la suspensión celular sobre la lámina limpia y seca. Se identificaron las láminas según la recodificación incógnita que se dio al inicio del protocolo.

K) Se realizó el proceso de tinción de las láminas con Giemsa (Gibco) al 4 %. En una caja de tinción limpia, se agregaron 50 mL de dH₂O, 50 mL de buffer Gurr (1 tableta disuelta en 500 mL de dH₂O) y 1 mL de Giemsa. Se dejaron ahí por 7 min, luego se lavaron con dH₂O dos veces en beakers distintos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las láminas se tiñeron preparando Giemsa fresco en un momento cercano al que se iban a analizar para que no pasaran mucho tiempo teñidas y así evitar que el tinte precipitara.

L) Se procedió con el análisis de 1000 (2000 para las cuatro dosis más bajas) células BN de linfocitos de las nueve dosis establecidas para la curva en el microscopio de luz (Olympus BX60). El conteo fue incógnito en el sentido que no se podía inferir la dosis en el momento del análisis. El Cuadro 1 muestra los criterios de evaluación para el conteo de MN y células BN (Fenech *et al.*, 2003).

3. Análisis estadístico

Para la elaboración de la curva y el análisis de datos se utilizó el software Dose Estimate (versión 5.2). Según Ainsbury (2010), este programa permite la estimación de dosis en diferentes situaciones que son comunes en la citogenética mediante cinco herramientas entre las que se encuentra la utilizada para el análisis de estos datos y la elaboración de la curva (Yield Curve Fitting). Esta herramienta permite el cálculo de los coeficientes de la curva basado en datos citogenéticos e incluye el cálculo de varianza del promedio y del estadístico *u-test* con base en la distribución de aberraciones (Ainsbury, 2010). Se obtuvo la curva preliminar de calibración dosis-efecto, la prueba de Chi-cuadrado (X^2) de bondad de ajuste para la distribución de Poisson y el ajuste al modelo lineal-cuadrático. También se obtuvieron las probabilidades asociadas a los coeficientes de la curva. Además, el software genera los valores de la U de Papworth y del índice de dispersión (σ^2/y). Dose Estimate también dispone de instrumentos adicionales que facilitan el procesamiento de los datos de accidentes de radiaciones para derivar las estimaciones de las dosis cuando las circunstancias no corresponden a exposiciones del cuerpo entero o agudas y recientes (OIEA, 2014). Además, es importante mencionar que según el OIEA (2014), para determinar los mejores coeficientes de ajuste se utiliza la técnica de máxima verosimilitud. Con este método, el mejor valor de ajuste de cada coeficiente se obtiene suponiendo que la distribución es de Poisson y maximizando la verosimilitud de las observaciones mediante el método de la reponderación iterativa de los cuadrados mínimos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De todas las láminas disponibles se realizaron tres rondas de conteo de células BN según las dosis. En el primer conteo completo se incluyeron solo ocho dosis 0 Gy, 0.3 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy, 1.5 Gy, 2 Gy, 2.5 Gy y 3 Gy y en cada una se contaron solo 1000 células BN. En el segundo conteo completo se incluyó la novena dosis (4 Gy) aparte de todas las anteriores del conteo anterior. Además, se contaron 2000 células BN para las dosis más bajas (0 Gy, 0.3 Gy y 0.5 Gy) y no 1000 células BN como en el primer conteo. En el último conteo sólo se evaluaron láminas de las dosis más bajas (0 Gy, 0.3 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy y 1.5 Gy) debido a que los datos obtenidos en el conteo anterior fueron muy diferentes a lo esperado y el software no asignó probabilidad a la prueba de Chi-cuadrado (X^2). Además,

se mantuvieron los datos para las otras dosis del análisis anterior debido a que sí se asemejaban a lo esperado en cuanto al aumento de MN respecto a la dosis.

Los datos obtenidos de los conteos se obtuvieron al realizar el análisis en el microscopio de luz (Fig. 4) que se procesaron con el software Dose Estimate (Cuadro 3, Cuadro 4, Cuadro 5) para obtener las curvas preliminares de calibración dosis-efecto según las tres rondas de conteo. El software brinda en el análisis el valor del Chi-cuadrado, los grados de libertad, la probabilidad y la ecuación cuadrática con las probabilidades de los coeficientes que corresponden al ajuste del modelo lineal-cuadrático según las tres rondas de conteo (Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7).

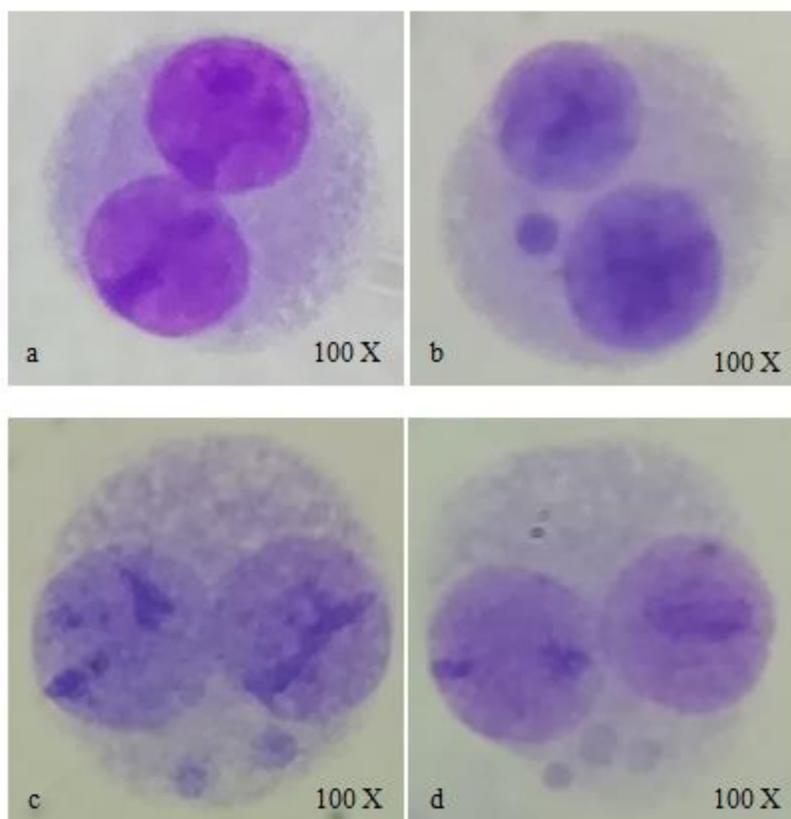


Fig. 4: Células BN de la donante sin MN (a), con un MN (b), dos MN (c) y tres MN (d).

Para el primer conteo el Cuadro 3 y la Fig. 5 muestran que la mayoría de dosis se comportan según lo esperado teóricamente en donde la cantidad de MN en las células BN aumenta conforme lo hace la dosis (excepto 0.3 Gy y 0.5 Gy). En el caso del segundo conteo el Cuadro 4 y la Fig. 6 muestran que varias de dosis se comportan según lo esperado teóricamente en donde la cantidad de MN en las células BN aumenta conforme lo hace la

dosis (excepto 0.3 Gy, 0.5 Gy, 1.0 Gy y 1.5 Gy). Para el último conteo, tanto el Cuadro 5 como la Fig. 7 muestran para la mayoría de dosis (excepto 0.5 Gy y 1.0 Gy) que la cantidad de MN en las células BN aumenta conforme lo hace la dosis por lo que los resultados corresponden a los esperados para este ensayo según el OIEA (2014).

El Cuadro 3 muestra las ocho dosis a las que se irradiaron las muestras de sangre y la cantidad de MN observados. Para todas las dosis se contó un total de 1000 células BN y la mayor cantidad de MN se encontró en las dosis más altas de 2.5 Gy y 3.0 Gy. Las células BN contadas tenían desde 0 MN hasta máximo 3 MN en donde este número máximo de MN se observó en la dosis más alta (3.0 Gy) y la mayor cantidad de células BN sin MN se contó en las dosis más bajas (0.0 Gy, 0.3 Gy y 0.5 Gy). Las dosis en las que no se encontró células BN con 2 MN fueron solamente 0.0 Gy, 0.3 Gy, 1.0 Gy y 1.5 Gy, mientras la dosis que mayor cantidad de células BN con 1 MN y 2 MN fue la de 3.0 Gy.

En el Cuadro 3 se puede ver que de las ocho dosis son cuatro las que no muestran sobredispersión con base en los valores de U (< 1.96) y del índice de dispersión (σ^2/y) < 1 . Según el OIEA (2014) para el caso de los MN, los datos tienden hacia la sobredispersión en todas las dosis. Los valores de $U > 1.96$ indican sobredispersión (cuatro de las ocho dosis: 0.5 Gy, 2.0 Gy, 2.5 Gy, 3.0 Gy). Los valores con sobredispersión muestran que la distribución de MN no se ajusta a Poisson. Asimismo, según σ^2/y (var/mean) = 1, la distribución de MN se ajusta a Poisson en las dosis donde no hay sobredispersión. La U es la unidad del índice de dispersión (var/mean) que para Poisson este índice debe ser 1. El hecho de que la distribución se ajuste a Poisson significa que al haber una irradiación no homogénea, es decir, un número elevado de trayectorias (TLE baja), la distribución del daño en las células es aleatoria así como la distribución de MN. De esta manera, cuatro de las ocho dosis que presentan sobredispersión tienen una distribución de MN que no se ajusta a Poisson.

Cuadro 3. Cantidad de MN, índice de dispersión (σ^2/y) y valores de U de Papworth por dosis evaluada en linfocitos de sangre periférica de la donante femenina irradiada con una fuente ^{60}Co de rayos gamma, primer conteo

Dosis Gy	Total células BN	Total MN	0 MN (células BN)	1 MN	2 MN	3 MN	σ^2/y	U
0.0	1000	4	996	4	0	0	0.997	-0.077

0.3	1000	5	995	5	0	0	0.996	-0.100
0.5	1000	5	996	3	1	0	1.400	9.900
1.0	1000	22	978	28	0	0	0.979	-0.481
1.5	1000	26	974	26	0	0	0.975	-0.570
2.0	1000	91	919	71	10	0	1.130	2.920
2.5	1000	100	909	82	9	0	1.080	1.820
3.0	1000	139	881	101	16	2	1.180	4.010

El Cuadro 4 muestra las nueve dosis a las que se irradiaron las muestras de sangre y la cantidad de MN observados. Para la mayoría de las dosis se contó un total de 1000 células BN (se contaron 2000 células BN para las primeras tres dosis más bajas: 0.0 Gy, 0.3 Gy, 0.5 Gy) y la mayor cantidad de MN se encontró en las dosis más altas de 2.0 Gy, 2.5 Gy, 3.0 Gy y 4.0 Gy. Las células BN contadas tenían desde 0 MN hasta máximo 3 MN en donde este número máximo de MN se observó en las dosis más altas (2.0 Gy, 2.5 Gy, 3.0 Gy y 4.0 Gy) y la mayor cantidad de células BN sin MN se contó en algunas de las dosis más bajas (0.0 Gy, 0.5 Gy y 1.0 Gy, realizando la proporción en 1000 células BN para poder compararlas). Las dosis en las que no se encontraron células BN con 2 MN fueron 0.0 Gy, 0.3 Gy, 0.5 Gy, 1.0 Gy y 1.5 Gy mientras que la dosis con mayor cantidad de células BN con 1 MN y 2 MN fue la de 4.0 Gy.

En el Cuadro 4 se puede ver que de las nueve dosis son cinco las que no muestran sobredispersión con base en los valores de U (< 1.96) y del índice de dispersión (σ^2/y) < 1 . Según el OIEA (2014) para el caso de los MN, los datos tienden hacia la sobredispersión en todas las dosis. Los valores de $U > 1.96$ indican sobredispersión (cuatro de las nueve dosis: 2.0 Gy, 2.5 Gy, 3.0 Gy, 4.0 Gy). Los valores con sobredispersión muestran que la distribución de MN no se ajusta a Poisson. Asimismo, según σ^2/y (var/mean) = 1, la distribución de MN se ajusta a Poisson en las dosis donde no hay sobredispersión. La U es la unidad del índice de dispersión (var/mean) que para Poisson este índice debe ser 1. El hecho de que la distribución se ajuste a Poisson significa que al haber una irradiación no homogénea, es decir, un número elevado de trayectorias (TLE baja), la distribución del daño en las células es aleatoria así como la distribución de MN. De esta manera, según estos valores, cuatro de las nueve dosis, que son las que presentan sobredispersión, tienen una distribución de MN que no se ajusta a Poisson.

Cuadro 4. Cantidad de MN, índice de dispersión (σ^2/y) y valores de U de Papworth por dosis evaluada en linfocitos de sangre periférica de la donante femenina irradiada con una fuente ^{60}Co de rayos gamma, segundo conteo

Dosis Gy	Total células BN	Total MN	0 MN (células BN)	1 MN	2 MN	3 MN	σ^2/y	U
0.0	2000	11	1989	11	0	0	0.995	-0.166
0.3	2000	17	1983	17	0	0	0.992	-0.261
0.5	2000	8	1992	8	0	0	0.996	-0.118
1.0	1000	3	997	3	0	0	0.998	-0.055
1.5	1000	16	984	16	0	0	0.985	-0.347
2.0	1000	66	940	55	4	1	1.150	3.320
2.5	1000	75	930	66	3	1	1.090	1.940
3.0	1000	91	917	77	4	2	1.130	2.920
4.0	1000	110	904	84	10	2	1.180	4.090

El Cuadro 5 muestra las nueve dosis a las que se irradiaron las muestras de sangre y la cantidad de MN observados. Para la mayoría de las dosis se contó un total de 1000 células BN (se contaron 2000 células BN para las primeras cuatro dosis más bajas: 0.0 Gy, 0.3 Gy, 0.5 Gy, 1.0 Gy) y la mayor cantidad de MN se encontró en las dosis más altas de 2.0 Gy, 2.5 Gy, 3.0 Gy y 4.0 Gy. Las células BN contadas tenían desde 0 MN hasta máximo 3 MN en donde este número máximo de MN se observó en las dosis más altas (2.0 Gy, 2.5 Gy, 3.0 Gy y 4.0 Gy) y la mayor cantidad de células BN sin MN se contó en las dosis más bajas (0.0 Gy, 0.3 Gy, 0.5 Gy y 1.0 Gy, realizando la proporción en 1000 células BN para poder compararlas). Las dosis en las que no se encontraron células BN con 2 MN fueron solamente 0.5 Gy y 1.0 Gy y la dosis que mayor cantidad de células BN con 1 MN y 2 MN tuvo fue la de 4.0 Gy.

En el Cuadro 5 se puede ver que de las nueve dosis solo dos no muestran no muestran sobredispersión con base en los valores de U (< 1.96) y del índice de dispersión (σ^2/y) < 1 . Según el OIEA (2014) para el caso de los MN, los datos tienden hacia la sobredispersión en todas las dosis. Los valores de U > 1.96 indican sobredispersión (todas las dosis excepto 0.5 Gy y 1.0 Gy). Los valores con sobredispersión muestran que la distribución de MN no se ajusta a Poisson. Asimismo, según σ^2/y (var/mean) = 1, la

distribución de MN se ajusta a Poisson en las dosis donde no hay sobredispersión. La U es la unidad del índice de dispersión (var/mean) que para Poisson este índice debe ser 1. El hecho de que la distribución se ajuste a Poisson significa que al haber una irradiación no homogénea, es decir, un número elevado de trayectorias (TLE baja), la distribución del daño en las células es aleatoria así como la distribución de MN. De esta manera, según estos valores, siete de las nueve dosis, que son las que presentan sobredispersión, tienen una distribución de MN que no se ajusta a Poisson.

Cuadro 5. Cantidad de MN, índice de dispersión (σ^2/y) y valores de U de Papworth por dosis evaluada en linfocitos de sangre periférica de la donante femenina irradiada con una fuente ^{60}Co de rayos gamma, último conteo

Dosis Gy	Total células BN	Total MN	0 MN (células BN)	1 MN	2 MN	3 MN	σ^2/y	U
0.0	2000	20	1981	18	1	0	1.090	2.940
0.3	2000	24	1977	22	1	0	1.070	2.320
0.5	2000	12	1988	12	0	0	0.994	-0.182
1.0	2000	28	1972	28	0	0	0.986	-0.435
1.5	1000	27	974	25	1	0	1.050	1.100
2.0	1000	66	940	55	4	1	1.150	3.320
2.5	1000	75	930	66	3	1	1.090	1.940
3.0	1000	91	917	77	4	2	1.130	2.920
4.0	1000	110	904	84	10	2	1.180	4.090

En la Fig. 5 se observa el resultado de la curva preliminar de calibración dosis-efecto del primer conteo obtenida en el software Dose Estimate (versión 5.2) en donde la menor cantidad de MN se vio en dosis más bajas y en las más altas hay mayor frecuencia de MN con los intervalos de confianza de 95 %. Con el Chi-cuadrado (X^2) de bondad de ajuste se determinan los valores de los coeficientes c , α y β que mejor concuerden con los puntos de los datos. Para determinar los mejores coeficientes de ajuste se utiliza la técnica de máxima verosimilitud. En este caso, el valor del X^2 es mayor a los grados de libertad (g.l.) lo que indica falta o pobreza en el ajuste ($X^2 = 13.6100 > \text{g.l.} = 5$). Por otra parte, la probabilidad asociada al $X^2 > 0.05$ ($p = 0.6667$) lo que indica que la hipótesis nula no se puede rechazar entonces la distribución de MN es igual a la esperada teóricamente.

Además, se puede ver que en las probabilidades de los coeficientes de la ecuación lineal-cuadrática solo la del coeficiente cuadrático (β) es significativa (< 0.05) ($p C = 0.2458$; $p \alpha = 1.1410$; $p \beta = 0.0090$) lo que indica pobreza de ajuste al modelo lineal-cuadrático. Las probabilidades de los coeficientes prueban su significancia de manera tal que los valores de los coeficientes sean distintos de 0 con una probabilidad < 0.05 ; en este caso solo la probabilidad del coeficiente β es < 0.05 . Como β es el único coeficiente distinto de 0 esto hace que la tendencia de la curva se asemeje en su forma a lo esperado.

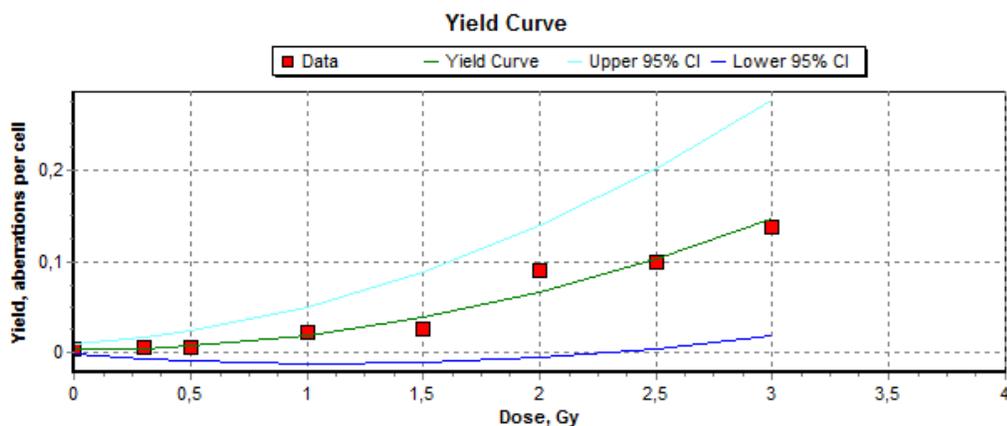


Fig. 5: Curva preliminar de calibración dosis-efecto basada en MN.

$$Y = 0.0038 (+/- 0.0029) + 0.0017 (+/- 0.0091)D + 0.0166 (+/- 0.0040)D^2$$

$$X^2 = 13.6100; \text{g.l.} = 5; p = 0.6667; (\text{z-test}): p A = 0.2458, p \alpha = 1.1410 p \beta = 0.0090$$

primer conteo

En la Fig. 6 se observa el resultado de la curva preliminar de calibración dosis-efecto del segundo conteo obtenida en el software Dose Estimate (versión 5.2) en donde la menor cantidad de MN se vio en dosis más bajas y en las más altas hay mayor frecuencia de MN con los intervalos de confianza de 95 %. Con el Chi-cuadrado (X^2) de bondad de ajuste se determinan los valores de los coeficientes c , α y β que mejor concuerden con los puntos de los datos. Para determinar los mejores coeficientes de ajuste se utiliza la técnica de máxima verosimilitud. En este caso, el valor del X^2 es mayor a los grados de libertad (g.l.) lo que indica falta o pobreza en el ajuste ($X^2 = 44.4800 > \text{g.l.} = 6$). Por otra parte, la probabilidad asociada al X^2 es < 0.05 ($p = 0.0000$) lo que indica que la hipótesis nula se puede rechazar, entonces la distribución de MN no es igual a la esperada teóricamente.

Además, se puede ver que en las probabilidades de los coeficientes de la ecuación lineal-cuadrática solo la del coeficiente cuadrático (β) es significativa (< 0.05) ($p C = 0.2037$; $p \alpha = 1.1440$; $p \beta = 0.0399$) lo que indica pobreza de ajuste al modelo lineal-cuadrático. Las probabilidades de los coeficientes prueban su significancia de manera tal que los valores de los coeficientes sean distintos de 0 con una probabilidad < 0.05 ; en este caso solo la probabilidad del coeficiente β es < 0.05 . Como β es el único coeficiente distinto de 0 esto hace que la tendencia de la curva se asemeje en su forma a lo esperado.

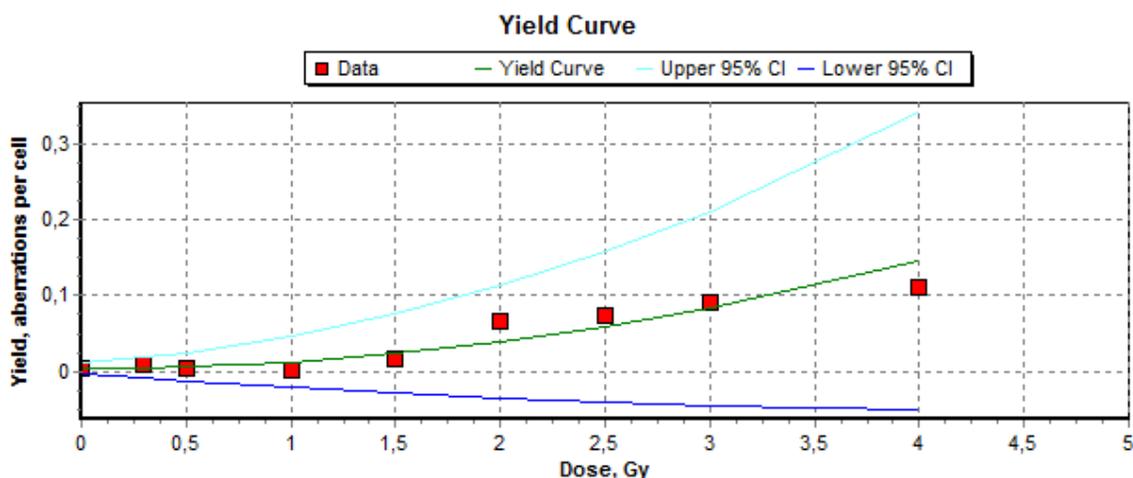


Fig. 6: Curva preliminar de calibración dosis-efecto basada en MN.

$$Y = 0.0053 (+/- 0.0037) + 0.0019 (+/- 0.0099)D + 0.0092 (+/- 0.0035)D^2$$

$X^2 = 44.4800$; g.l. = 6; $p = 0.0000$; (z-test): $p A = 0.2037$, $p \alpha = 1.1440$ $p \beta = 0.0399$
segundo conteo

En la Fig. 7 se observa el resultado de la curva preliminar de calibración dosis-efecto del último conteo, obtenida en el software Dose Estimate (versión 5.2) en donde la menor cantidad de MN se vio en dosis más bajas y en las más altas hay mayor frecuencia de MN con los intervalos de confianza de 95 %. Con el Chi-cuadrado (X^2) de bondad de ajuste se determinan los valores de los coeficientes c , α y β que mejor concuerden con los puntos de los datos. Para determinar los mejores coeficientes de ajuste se utiliza la técnica de máxima verosimilitud. En este caso, el valor del X^2 es mayor a los grados de libertad (g.l.) lo que indica falta o pobreza en el ajuste ($X^2 = 27.5900 > g.l. = 6$). Por otra parte, la probabilidad asociada al X^2 es > 0.05 ($p = 0.6667$) lo que indica que la hipótesis nula no se puede rechazar entonces la distribución de MN es igual a la esperada teóricamente.

Además, se puede ver que en las probabilidades de los coeficientes de la ecuación lineal-cuadrática solo la del coeficiente cuadrático (β) es significativa (< 0.05) ($p_C = 0.0732$; $p_\alpha = 0.7716$; $p_\beta = 0.0411$) lo que indica pobreza de ajuste al modelo lineal-cuadrático. Las probabilidades de los coeficientes prueban su significancia de manera tal que los valores de los coeficientes sean distintos de 0 con una probabilidad < 0.05 ; en este caso solo la probabilidad del coeficiente β es < 0.05 . Como β es el único coeficiente distinto de 0 esto hace que la tendencia de la curva se asemeje en su forma a lo esperado.

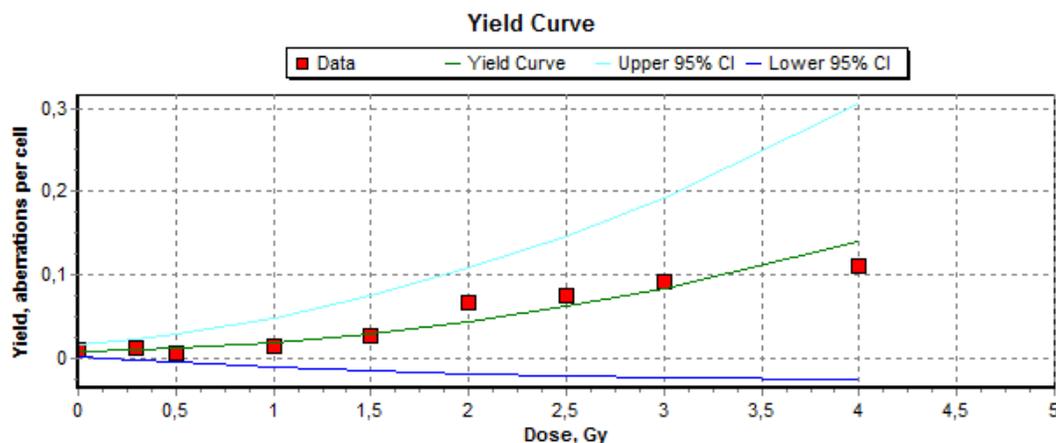


Fig. 7: Curva preliminar de calibración dosis-efecto basada en MN.

$$Y = 0.0081 (+/- 0.0037) + 0.0026 (+/- 0.0085)D + 0.0076 (+/- 0.0029)D^2$$

$X^2 = 27.5900$; g.l. = 6; $p = 0.6667$; (z-test): $p_A = 0.0732$, $p_\alpha = 0.7716$ $p_\beta = 0.0411$
último conteo

El documento de la ISO: 17099 (2014) señala particularmente que para dosis menores de 0.5 Gy se deben contar al menos 2000 células BN por dosis por donador y para las dosis mayores a 0.5 Gy el conteo debe llegar a 1000 células BN. Esto se cumplió sólo para el segundo conteo ya que para el primer conteo en todas las dosis se llegó a 1000 células BN y en el caso del último conteo la dosis de 1.0 Gy llegó a 2000 células BN y no 1000 como se recomienda; este último caso se debe a un error humano. Ainsbury (2010) menciona que cuando las probabilidades de los coeficientes no muestran significancia, el ajuste es pobre. Se sugiere que la falta de significancia en la probabilidad del coeficiente lineal (α) se puede deber al bajo conteo de células BN por dosis debido a que solo se contó con un donante. De esta manera, se recomienda el aumento de la cantidad de los donantes como es establecido para las curvas de calibración en donde mínimo se solicitan seis (ISO:

17099, 2014). Este es un estudio preliminar que pretende ser base para que en el futuro la curva resultante se pueda robustecer con más datos. Este proyecto con una sola donadora es necesario para ajustar la técnica que le permita al personal del laboratorio (INISA) continuar con las irradiaciones y el análisis de muestras de los seis donantes establecidos.

Rastkhah *et al.* (2015) también utilizaron el software Dose Estimate para obtener las curvas de calibración para MN en sus grupos de estudio. Este software es utilizado y fue desarrollado por especialistas en dosimetría de la Agencia de Protección Sanitaria de Reino Unido (HPA) con el fin de simplificar el análisis matemático y estadístico de los datos citogenéticos y que se basa en los métodos citogenéticos detallados por el OIEA tal como el ajuste a la distribución de Poisson (Ainsbury & Lloyd, 2010). Por lo tanto, la utilización de este software para aplicaciones citogenéticas y la elaboración de la curva de calibración son apoyadas por otros estudios (Esposito Mendes, 2020) en este campo de la DB. Entre otras aplicaciones, este software también permite hacer cálculos de dosis con los coeficientes de la curva que se genera para cada laboratorio.

Rastkhah *et al.* (2015) observaron un aumento de la frecuencia de MN conforme al incremento de la dosis según el modelo lineal-cuadrático en la construcción de la curva de calibración dosis-efecto. De esta manera, se confirman los resultados obtenidos (Fig. 7) con este estudio. Además, se debe mencionar que el basal de MN de la donante (Cuadro 5) es similar al reportado en Rastkhah *et al.* (2015) en cuyo estudio se contabilizaron entre 6-21 MN por 1000 células BN. Esta frecuencia espontánea de MN es un buen indicador del daño genético acumulado durante la vida del individuo en sus linfocitos circulantes. Por lo tanto, según estos autores el ensayo de CBMN es un método alternativo confiable, fácil y valioso para la DB.

A pesar de que los resultados finales (Cuadro 5, Fig. 7) son aceptables según los resultados estadísticos explicados anteriormente, es claro que la cantidad de MN reportada en la literatura (Lusiyanti, Alatas, Syaifudin, & Purnami, 2016; Tamizh Selvan, Chaudhury, & Venkatachalam, 2015) no corresponde a los resultados aquí presentados. Sin embargo, como se mencionó antes, el conteo del basal de MN de la donante se encuentra en el rango de valores reportados en la literatura según su género: un promedio de 65 MN por cada mil células BN y para las mujeres específicamente 70 MN (Zalacain *et al.*, 2005; Bonassi, 2001). A pesar de que en Costa Rica no hay un conteo basal de MN para la población, se

utilizan como referencia los datos del OIEA (2014) que indican que esta información es variable según varios factores como la edad y el sexo de los donantes ya que se han reportado desde 0 a 40 MN por 1 000 células BN.

Según el criterio de un experto consultado quien labora en el Centro de Protección e Higiene para las Radiaciones (CPHR) de Cuba (González Mesa, comunicación personal, 13 de agosto de 2019), el motivo por el que la cantidad de MN reportada en la literatura no corresponde fielmente a los resultados de este estudio puede ser una sub-lectura de los MN debido a un problema de contraste en el momento de la tinción con Giemsa y, que cuando se observaron las láminas al microscopio, el analista no distinguió los MN presentes y no los contó. Aunque no fue el caso que sucedió en este análisis, según la experiencia de Varga (2004) con el Giemsa el analista tiende a contar artefactos y menciona que además este tinte no es adecuado para el conteo automatizado ya que genera falsos positivos debido al ruido (*background*) en las láminas. De esta manera, se proponen otros métodos de tinción complementarios (yoduro de propidio (Varga, 2004; Tamizh Selvan et al., 2015) o el tratamiento de ARNasa (Hayata, 1993)) al Giemsa que permitan mejorar el contraste de la lámina y por ende la lectura manual de la misma.

Además, respecto a este tema de la sub-lectura de MN, otros analistas experimentados del laboratorio (INISA) también presentaron este mismo inconveniente en cuanto a su análisis manual con Giemsa y automatizado con Giemsa y con DAPI de las láminas de distintas dosis que se utilizaron para esta curva preliminar; asimismo, Varga (2004) mencionó tener problemas con los tintes, contrastes y el conteo manual y automatizado. En el estudio de Tamizh Selvan et al. (2015), se puede evidenciar la diferencia en la frecuencia de MN respecto a los tintes, las dosis y el método de conteo porque mencionan que el yoduro de propidio en dosis mayores a 2 Gy en el conteo automatizado genera valores menores que el conteo manual. Para las dosis menores de 1 Gy ellos muestran que hay mejor conteo automatizado con Giemsa. De esta manera, se reafirma que indistintamente del analista, tinción y método de conteo, el problema de sub-lectura persiste en estas láminas.

Asimismo, respecto a la sub-lectura vale rescatar que según el OIEA (2014) y la Fig. 3 de una curva de calibración dosis- efecto de 47 donantes para MN con una fuente de ^{60}Co de rayos gamma y una tasa de dosis de 0.5 Gy/min, los valores esperados para 1 Gy y

4 Gy aproximadamente equivalen a 10 MN por cada 100 células BN y 70 MN por cada 100 células BN, respectivamente. Haciendo la conversión a mil y dos mil células BN y comparándolos con los datos obtenidos en este trabajo, se tiene que a 1 Gy se pueden encontrar aproximadamente 200 MN por cada 2 000 células BN y para 4 Gy contar 700 MN en 1 000 células BN; sin embargo, en este proyecto se contabilizaron en 1 Gy, 28 MN en 2 000 células BN y en 4 Gy, 110 MN en 1 000 células BN. De esta manera, con la literatura, se puede corroborar el problema de sub-lectura que mencionó el experto y que experimentaron los técnicos del laboratorio.

Por otro lado, en cuanto a los criterios estandarizados de evaluación para el conteo (Cuadro 1) estos son indispensables para esta labor; sin embargo, hay que tener presente la posible subjetividad entre analistas y por esta razón es que se espera que haya análisis de varios colaboradores experimentados en un mismo laboratorio. Además, se sabe que en comparación con el conteo automático, el manual es más laborioso y el proceso está sujeto a la fatiga y al sesgo del analista lo que lleva a inter e intra variaciones en el conteo (Rodrigues, 2018). Las inter comparaciones de láminas entre laboratorios de la Red (LBDNet) son ejemplo de la variación de resultados entre analistas debido a que no es fácil el desarrollo de un buen resultado en la técnica ni la interpretación de las láminas. Es por esto que una curva de MN ocupa mínimo seis donantes por ser un biomarcador variable y, como se ha mencionado antes, que varios analistas intervengan en el análisis (ISO: 17099, 2014; OIEA, 2014).

En comparación con otros estudios de curvas en los que se evalúan diversas técnicas como los MN (Kang, Yun, Kim, & Kim, 2016), uno menciona la técnica de MN pero en rayos X (Lusiyanti et al., 2016) en donde se utilizaron 30 donantes saludables no fumadores entre los 25 y 55 años (15 mujeres y 15 hombres) con dosis desde 0.5 Gy hasta 5 Gy (seis dosis incluyendo el control de 0 Gy). En este estudio, a las 44 h de cultivo agregaron 45 µl de citocalasina B (Cyt-B) (3 mg/ml). Después centrifugaron a 800 rpm durante 5 min y agregaron 6 mL de KCl frío (0.075 M KCl). Por último, fijaron las células con metanol: ácido acético glacial (10:1) diluido con solución Ringer. Ellos reportan los coeficientes de la curva como $Y = 0.022 \pm 0.0069 + 0.112 \pm 0.019D + 0.028 \pm 0.006D^2$ y mencionan que hubo una relación significativa entre la frecuencia de MN y la dosis de radiación. Por último, en este estudio ellos validaron estos coeficientes con la estimación de dosis de tres

donantes y en los tres casos la dosis estimada (1.28 Gy, 1.40 Gy y 1.43 Gy) fue cercana a la real (1.5 Gy). Además, otro estudio se hizo con rayos gamma para MN (Köksal, Dalcı, & Pala, 1996) en donde hubo tres donantes jóvenes y sanos no fumadores (dos hombres y una mujer), su sangre se expuso a Co-60 con una tasa de dosis de 45.73 R/min, se irradió con dosis desde 0.10 Gy a 5.0 Gy para un total de 10 dosis incluido el control 0 Gy. Los linfocitos se cultivaron por 68 h a 37°C y se agregó 6 /zg/ml de citocalasina B (Sigma) a las 48 h. Los coeficientes y los resultados del Chi de la curva fueron $Y=1.143 \times 10^{-3} (\pm 4.3417 \times 10^{-4}) + 4.437 \times 10^{-3} (\pm 2.2087 \times 10^{-3}) + 1.161 \times 10^{-2} (\pm 9.19443 \times 10^{-3})$; $X^2= 0.22$; g.l.= 8; $p= 0.005$. Los autores mencionan que su curva se ajusta al modelo lineal-cuadrático, que solo los datos de las tres primeras dosis no mostraron sobredispersión y que el número de células BN totales para los tres donadores por dosis es elevado y variado (desde 1021 en la dosis 1.58 Gy hasta 11964 en el control de 0 Gy). De esta manera, se puede ver que, con mucho mayor cantidad de donantes y algunas variaciones en el protocolo del procedimiento de laboratorio, es posible obtener una curva más robusta desde el punto de vista estadístico.

Por último, otra posible razón de que los resultados se ajusten mínimamente a la literatura puede ser el factor de la radiosensibilidad de la donante. Este término se refiere a la gran variedad de efectos y magnitud de respuesta de un sistema biológico tras una exposición a RI según su frecuencia y severidad en el organismo (Montoro et al., 2014; Diarium, 2013). Por ejemplo, la radiosensibilidad de los tejidos a las RI depende de las células que lo componen por lo que las más diferenciadas son menos radiosensibles mientras que las menos diferenciadas son más radiosensibles (SEPR, 2018; CSN, 2013) donde el linfocito es la célula más radiosensible del organismo (Alcaraz, s.f.). Además, hay factores como la calidad de la radiación y el ciclo celular que influyen en la respuesta celular ante la RI; es decir, la TLE baja produce lesiones menos complejas y más fáciles de reparar que la TLE alta y la mitosis es una fase muy radiosensible respecto a la fase S (CSN, 2013). De esta manera se podría sugerir que la donante presenta factores individuales relacionados con una baja radiosensibilidad que generan menor cantidad de MN a lo esperado y que, aunado al posible problema de contraste mencionado anteriormente, puede generar los resultados obtenidos en este estudio. También es importante señalar que las variaciones entre las personas se pueden deber a componentes

genéticos relacionados con la reparación del ADN, alteraciones del sistema inmune o enfermedades como la diabetes (Montoro et al., 2014).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con la elaboración de este trabajo, se concluye que el ajuste de la curva fue aceptable estadísticamente y que probablemente la sub-lectura de MN y el problema de contraste general influyeron en los ajustados coeficientes y probabilidades. Además, se observó que los datos corresponden de cierta manera a los esperados según la literatura (a mayor dosis, mayor cantidad de MN) por lo que se reafirma la utilización de los MN como un biomarcador importante y alternativo (al estándar de oro - CD) ante accidentes radiológicos o nucleares especialmente cuando hay víctimas múltiples. Es importante mencionar que se utilizó el protocolo estandarizado en el manual del OIEA utilizado por muchos laboratorios en el mundo y que los resultados obtenidos no invalidan la técnica sino que más bien indican que puede mejorar con la retroalimentación de los distintos aportes de investigaciones y laboratorios.

Por lo tanto, la realización de esta curva preliminar de calibración dosis-efecto para MN es una contribución significativa a los avances científicos de nuestro país. Esto se debe a que se logra iniciar el proceso de implementación dando aportes para el mejoramiento de este ensayo que permitan su utilización en posibles accidentes radioactivos en la región centroamericana. Este trabajo contribuye en la etapa base de la curva de calibración del Servicio de DB del INISA.

De esta manera, se recomienda continuar en el INISA con la incorporación de mayor cantidad y variedad de donantes, de analistas del Laboratorio de Citogenética (Anexo 1), de otras tinciones como el yoduro de propidio o el tratamiento de ARNasa previo a la tinción con Giemsa que permitan mejorar el contraste en el conteo manual y de la utilización del equipo automatizado para robustecer la curva de calibración obtenida. Esto con el objetivo de que pueda ser utilizada en personas sobreirradiadas en nuestro país o en la región y así puedan recibir un tratamiento oportuno. El procedimiento automatizado que realiza el INISA no fue parte de este proyecto sino que se utiliza para la implementación de la técnica de CD y en el futuro con MN para rayos X. Este trabajo

aporta al INISA el conocimiento adquirido de la tinción con Giemsa y las otras sugerencias de tinción para mejorar el contraste.

Además, para futuros estudios de curvas de calibración y las nuevas irradiaciones de los proyectos del INISA, se recomienda hacer una verificación de la dosis administrada utilizando un dosímetro físico. Asimismo, en el momento de la preparación de las láminas es importante verificar con un microscopio de contraste de fases que estas no queden muy diluidas ni muy concentradas para facilitar el análisis y, a la hora de teñirlas, verificar el tiempo de tinción, el enjuague abundante con dH_2O y un buen contraste al iniciar la lectura en el microscopio de luz.

REFERENCIAS

- Ainsbury, L. (2010). *Dose Estimate (Version 4.0) Cytogenetics Dose Estimation Software*. Health Protection Agency Centre for Radiation, Chemical and Environmental Hazards. Chilton, Didcot, Oxfordshire, England.
- Ainsbury, E. A., & Lloyd, D. C. (2010). Dose Estimation Software for Radiation Biodosimetry. *Health Physics*, 98(2), 290-295.
- Agrawala, P. K., Adhikari, J. S., & Chaudhury, N. K. (2010). Lymphocyte chromosomal aberration assay in radiation biodosimetry. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2(3), 197-201. DOI: 10.4103/0975-7406.68501
- Akyıl, D., Eren, Y., Konuk, M., Tepekozcan, A., & Sağlam, E. (2016). Determination of mutagenicity and genotoxicity of indium tin oxide nanoparticles using the Ames test and micronucleus assay. *Toxicology and industrial health*, 32(9), 1720-1728.
- Alcaraz, M. (2001). Tema 6 Interacción de la radiación con la materia viva. M. Alcaraz (Coord.), En *Bases físicas y biológicas del radiodiagnóstico médico Texto y cuaderno de prácticas*. España: Universidad de Murcia. Recuperado de <https://webs.um.es/mab/miwiki/lib/exe/fetch.php?media=t6.pdf>
- Antunes, A. C., Martins, V., Cardoso, J., Santos, L., & Monteiro-Gil, O. (2014). The cytokinesis-blocked micronucleus assay: Dose estimation and inter-individual differences in the response to γ -radiation. *Mutation Research*, 760, 17-22.

- Bolognesi, C., Balia, C., Roggieri, P., Cardinale, F., Bruzzi, P., Sorcinelli, F., ... Righi, E. (2011). Micronucleus test for radiation biodosimetry in mass casualty events: Evaluation of visual and automated scoring. *Radiation Measurements*, 46, 169-175.
- Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Roggieri, P., Ceppi, M., Bruzzone, M., ... Benedetti, D. (2017). Inter-laboratory consistency and variability in the buccal micronucleus cytome assay depends on biomarker scored and laboratory experience: results from the HUMNxl international inter-laboratory scoring exercise. *Mutagenesis*, 32(2), 257-266.
- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y., Ceppi, M., Chang, W. P. ... Zijno, A. (2001). HUman MicroNucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria, and Host Factors on the Frequency of Micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37, 31-45.
- Carbajal, M. I. (2012). *Comportamiento de linfocitos humanos expuestos a un haz de neutrones del reactor Triga Mark III* (Tesis de Licenciatura). Tecnológico de Estudios Superiores de Huixquilucan, México.
- Cascón, A. (2009). Riesgos asociados con las radiaciones ionizantes. *Revista Argentina de Cardiología*, 77(2), 123-128.
- Castro, R., Ramírez, V., & Cuenca, P. (2004). Análisis de micronúcleos y otras anormalidades nucleares en el epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. *Revista de Biología Tropical*, 52(3), 611-621.
- Castro-Volio, I. (2013). Indicadores citogenéticos para la identificación de exposición a radiación ionizante en humanos. *Acta Médica Costarricense*, 55(3), 110-117.
- Consejo de Seguridad Nuclear (CSN) España. (2013). *Tema 7: Aspectos generales de la interacción de la radiación con el medio biológico*. Recuperado de http://csn.ciemat.es/MDCSN/recursos/ficheros_md/1581136598_1572009112950.pdf
- Consejo de Seguridad Nuclear (CSN) España. (26 febrero 2015). *Las radiaciones (monografía)*. Recuperado de <https://www.csn.es/radiaciones-ionizantes>
- Di Giorgio, M., Sardi, M., Busto, E., Vallerga, M.B., & Taja, M.R. (2003). Ensayo de micronúcleos en linfocitos humanos como biodosímetro de exposiciones in vivo

- agudas y crónicas. En *VI Congreso Regional de Seguridad Radiológica y Nuclear*. Congreso llevado a cabo en Lima, Perú.
- Di Giorgio, M. (1° de diciembre de 2017). Importancia de los laboratorios de Dosimetría Biológica en la respuesta a emergencias radiológicas, como soporte en las exposiciones ocupacionales y su contribución en la práctica clínica-Experiencia en Argentina. Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) - Universidad de Costa Rica.
- Diarium (Blog Universidad de Salamanca). (2013). *Radiobiología*. Recuperado de <https://diarium.usal.es/lcal/files/2013/10/Radiobiolog%C3%ADa-y-radiosensibilidad.pdf>
- Esposito Mendes, M., Conceição Goes de Mendonça, J., Hwang, S., Di Giorgio, M., Farias de Lima, F., & Santos, N. (2020). Calibration curves by ⁶⁰Co with low dose rate are different in terms of dose estimation – a comparative study. *Genetics and Molecular Biology*, 43(1), e20180370.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104. DOI: 10.1038/nprot.2007.77
- Fenech, M. (2010). The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Physics*, 98(2), 234-243.
- Fenech, M., & Bonassi, S. (2011). The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 26(1), 43-49.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., & Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534, 65-75.
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., ... Kirsch-Volders, M. (2016). Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 770, 12-25.

- Gotoh, E. (2012). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Recuperado de <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/BiodosimetryID20114.html>
- Hayata, I. (1993). Removal of Stainable Cytoplasmic Substances from Cytogenetic Slide Preparations. *Biotechnic and Histochemistry*, 68(3), 150-152.
- International Standard ISO:17099. (2014). *Radiological protection-Performance criteria for laboratories using the cytokineses block micronucleus (CBMN) assay in peripheral blood lymphocytes for biological dosimetry*.
- Kang, C. M., Yun, H. J., Kim, H., & Kim, C. S. (2016). Strong correlation among three biodosimetry techniques following exposures to ionizing radiation. *Genome Integrity*, 7, 11.
- Khanal, S., Singh, P., Avlasevich, S. L., Torous, D. K., Bemis, J. C., & Dertinger, S. D. (2018). Integration of liver and blood micronucleus and Pig-a gene mutation endpoints into rat 28-day repeat-treatment studies: Proof-of-principle with diethylnitrosamine. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 828, 30-35.
- Köksal, G., Dalcı, D. Ö., & Pala, F. S. (1996). Micronuclei in human lymphocytes: the Co-60 gamma-ray dose-response. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 359(2), 151-157. DOI: 10.1016/s0165-1161(96)90261-7
- Lamadrid-Boada, A. I., Mandina-Cardoso, T., González-Mesa, J. E., Romero-Aguilera, I., & García-Lima, O. (2011). Nuevas curvas de calibración para la dosimetría biológica en Cuba. *Nucleus*, 49, 3-8.
- La Nación. (1996). *Consternación por la tragedia con cobalto*. Recuperado de http://www.nacion.com/ln_ee/1996/octubre/13/pagina04.html
- La Nación. (2016). Sobreirradiados: Así lo comunicó la CCSS aquel viernes hace 20 años. Recuperado de <https://www.nacion.com/el-pais/sobreirradiados-asi-lo-comunico-la-ccss-aquel-viernes-hace-20-anos/XRPAK6XSBNAWHDR5VSM3HS4UMI/story/>
- La Nación. (2018a). *Caja investiga muerte de sancarléna por posible sobreirradiación en hospital*. Recuperado de <https://www.nacion.com/el-pais/salud/caja-investiga-muerte-de-sancarléna-por-posible/GZQZIN5O6FHN3PKJZSDV4DR3EQ/story/>
- La Nación. (2018b). *Posible error humano habría provocado muerte de paciente por sobreirradiación*. Recuperado de <https://www.nacion.com/el-pais/salud/posible->

- error-humano-habria-provocado-muerte-
de/TN3UNX6B7RBIFORIWU7N66GX4/story/
- Lee, J. K. (2011). Practical applications of cytogenetic biodosimetry in radiological emergencies. *The Korean Journal of Hematology*, 46(2), 62-64 DOI: 10.5045/kjh.2011.46.2.62
- Lusiyanti, Y., Alatas, Z., Syaifudin, M., & Purnami, S. (2016). Establishment of a dose-response curve for X-ray-induced micronuclei in human lymphocytes. *Genome Integrity*, 7(7), 1-4.
- Martin, P. R., Berdychevski, R. E., Subramanian, U., Blakely, W. F., & Prasanna P. G. S. (2007). Sample Tracking in an Automated Cytogenetic Biodosimetry Laboratory for Radiation Mass Casualties. *Radiation Measurements*, 42(6-7), 1119-1124.
- Martínez-Fernández, M. L., Sánchez-Izquierdo, M.D., & Martínez-Frías, M.L. (2010). Resumen de la evolución de las técnicas de citogenética y genética molecular para la identificación de las alteraciones genéticas del desarrollo embrionario. *Semergen*, 36(9), 520-525. DOI: 10.1016/j.semereg.2010.09.002
- Mirion Technologies. (3 Abril 2015). *Types of Ionizing Radiation*. Recuperado de <https://www.mirion.com/learning-center/radiation-safety-basics/types-of-ionizing-radiation>
- Montoro, A., Sebastia, N., Rodrigo, R., Hervás, D., Nacher, O. A., Martí, L., ... León, Z. (2014). Evaluación de la radiosensibilidad del personal sanitario en procedimientos de tratamiento o diagnóstico médico con radiaciones. *Seguridad y Medio Ambiente*, 134, 15-25.
- Olivo, J. C. F. (2016). A Statistical Evaluation of In Vitro Micronucleus Assay in Toxicology. *CLSU International Journal of Science & Technology*, 1(2), 1-6.
- Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). (1999). *Sobreexposicion accidental de pacientes de radioterapia en San José (Costa Rica)*. Viena, Austria.
- Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). (2014). Dosimetría citogenética: aplicaciones en materia de preparación y respuesta a las emergencias radiológicas. EPR-Biodosimetry 2011. Recuperado de https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/EPR_Biodosimetry_S_web.pdf

- Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Noordermeer, S. M., Canny, M. D., Brun, C. M., Strecker, J., ... Durocher, D. (2014). Mitosis Inhibits DNA Double-Strand Break Repair to Guard Against. *Science* 344, 189-193.
- Pejchal, J., Vasilieva, V., Hristozova, M., Vilasová, Z., Vávrová, J., Alyakov, M.,... Dresler, J. (2011). Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN) Assay/CBMN Cytome Assay in Human Lymphocytes After in Vitro Irradiation and Its Use in Biodosimetry. *Military Medical Science Letters*, 80, 28-37.
- Ramírez, V., & Cuenca, P. (2001). Evaluation of micronucleus frequency in lymphocytes of individuals occupationally exposed to pesticides. *Revista de Biología Tropical*, 49(1), 1-8.
- Rastkhah, E., Zakeri, F., Ghoranneviss, M., Rajabpour, M. R., Farshidpour, M. R., Mianji, F., & Bayat, M. (2015). The cytokinesis-blocked micronucleus assay: dose-response calibration curve, background frequency in the population and dose estimation. *Radiation and Environmental Biophysics*. DOI: 10.1007/s00411-015-0624-3
- Rodrigues, M. A., Beaton-Green, L. A., Wilkins, R. C., & Fenech, M. F. (2018). The potential for complete automated scoring of the cytokinesis block micronucleus cytome assay using imaging flow cytometry. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836, 53-64. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2018.05.003
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry* 73, 39-85. DOI: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723
- SENUBIO/Isirum. (2006). Dosimetría biológica. Recuperado de http://www.upv.es/crib/docs/ficha_senubio_dosimetria.pdf
- Sociedad Española de Protección Radiológica (SEPR). (2018). *Información general*. Recuperado de [https://www.sepr.es/component/search/?searchword=informaci%C3%B3n%20general&ordering=newest&searchphrase=exact&limit=10&areas\[0\]=docman](https://www.sepr.es/component/search/?searchword=informaci%C3%B3n%20general&ordering=newest&searchphrase=exact&limit=10&areas[0]=docman)

- Syaifudin, M., Lusiyanti, Y., Purnami, S., Lee, Y. S., & Kang, C. M. (2017). Assessment of Ionizing Radiation Induced Dicentric Chromosome and Micronuclei in Human Peripheral Blood Lymphocytes for Preliminary Reconstruction of Cytogenetic Biodosimetry. *Atom Indonesia*, 43(1), 47-54.
- Tamizh Selvan, G., Chaudhury, N. K., & Venkatachalam, P. (2015). Comparison of results of the manual and automated scoring of micronucleus frequencies in ⁶⁰Co-irradiated peripheral blood lymphocytes for triage dosimetry. *Applied Radiation and Isotopes*, 97, 70-77.
- Terradas, M., Martín, M., Tusell, L., & Genescà, A. (2009). DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective-damage response. *DNA Repair*, 8, 1225-1234.
- Terradas, M., Martín, M., Tusell, L., & Genescà, A. (2010). Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutation Research*, 705, 60-67.
- Terzoudi, G. I., & Pantelias, G. E. (2006). Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualisation after exposure to ionising radiation. *Radiation Protection Dosimetry*, 122(1-4), 513-520.
- Thierens, H., & Vral, A. (2009). The micronucleus assay in radiation accidents. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 45(3), 260-264.
- Varga, D., Johannes, T., Jainta, S., Schuster, S., Schwarz-Boeger, U., Kiechle, M., Patino Garcia, B., & Vogel, W. (2004). An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis. *Mutagenesis*, 19(5), 391-397. DOI: 10.1093/mutage/geh047
- Vral, A., Fenech, M., & Thierens, H. (2011). The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*, 26(1), 11-17. DOI:10.1093/mutage/geq078
- Wong, K. F, Siu, L. L. P, Ainsbury, E, & Moquet, J. (2013). Cytogenetic biodosimetry: what it is and how we do it. *Hong Kong Medical Journal*, 19(2), 168-173.
- Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L., & Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 277-236.

ANEXO 1

Cuadro 1. Cantidad de MN, índice de dispersión (σ^2/y) y valores de U de Papworth por dosis evaluada en linfocitos de sangre periférica de la donante femenina irradiada con una fuente ^{60}Co de rayos gamma*

Dosis Gy	Total células BN	Total MN	0 MN (células BN)	1 MN	2 MN	3 MN	σ^2/y	U
0.0	2000	6	1994	6	0	0	0.029	-0.087
0.3	2000	20	1981	18	1	0	0.031	2.940
0.5	2000	31	1969	31	0	0	0.031	-0.482
1.0	1000	26	975	24	1	0	0.044	1.180
1.5	1000	60	941	58	1	0	0.044	-0.579
2.0	1000	92	912	84	4	0	0.044	-0.091
2.5	1000	109	898	95	7	0	0.045	0.459
3.0	1000	165	849	137	14	0	0.045	0.128
4.0	1000	225	806	167	23	4	0.045	1.950

*Evaluación realizada por un analista del Laboratorio de Citogenética del INISA en un microscopio de luz

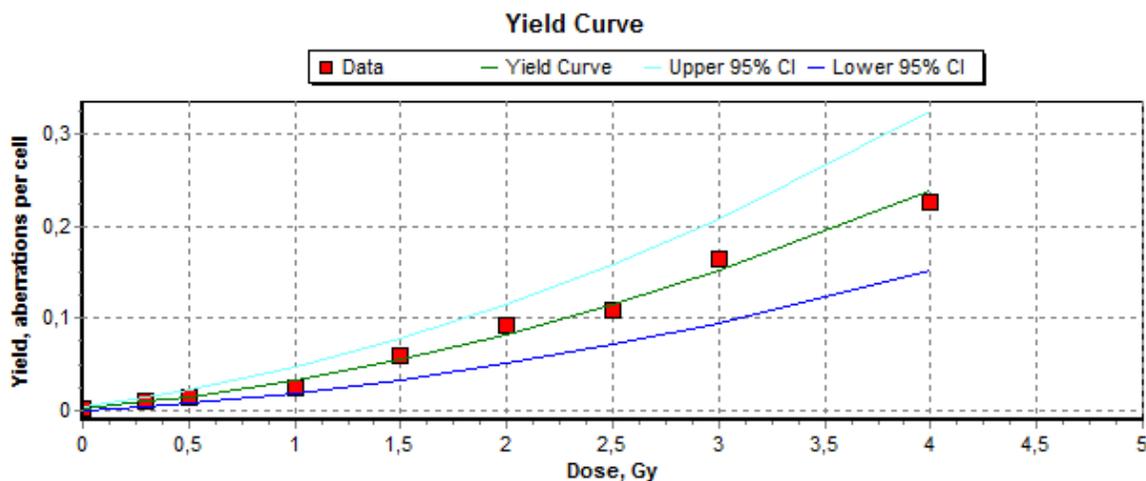


Fig. 1: Curva preliminar de calibración dosis-efecto basada en MN.

$$Y = 0.0028 (+/- 0.0011) + 0.0215 (+/- 0.0043)D + 0.0094 (+/- 0.0016)D^2$$

$X^2 = 5.1150$; g.l. = 6; $p = 0.8430$; (z-test): $p_A = 0.0462$, $p_\alpha = 0.0025$, $p_\beta = 0.0011$
(Evaluación realizada por un analista del Laboratorio de Citogenética del INISA en un microscopio de luz)

Cuadro 2. Cantidad de MN, índice de dispersión (σ^2/y) y valores de U de Papworth por dosis evaluada en linfocitos de sangre periférica de la donante femenina irradiada con una fuente ^{60}Co de rayos gamma*

Dosis Gy	Total células BN	Total MN	0 MN (células BN)	1 MN	2 MN	3 MN	σ^2/y	U
0.0	4000	26	3975	24	1	0	1.070	3.220
0.3	4000	44	3958	40	2	0	1.080	3.630
0.5	4000	43	3957	43	0	0	0.989	-0.475
1.0	2000	54	2947	52	1	0	1.020	0.757
1.5	2000	87	1915	83	2	0	1.000	0.095
2.0	2000	158	1852	139	8	1	1.160	1.930
2.5	2000	184	1828	161	10	1	1.050	1.580
3.0	2000	256	1766	214	18	2	1.060	1.900
4.0	2000	335	1710	251	33	6	1.140	4.360

*Evaluación realizada por un analista del Laboratorio de Citogenética del INISA y los datos del último conteo en un microscopio de luz

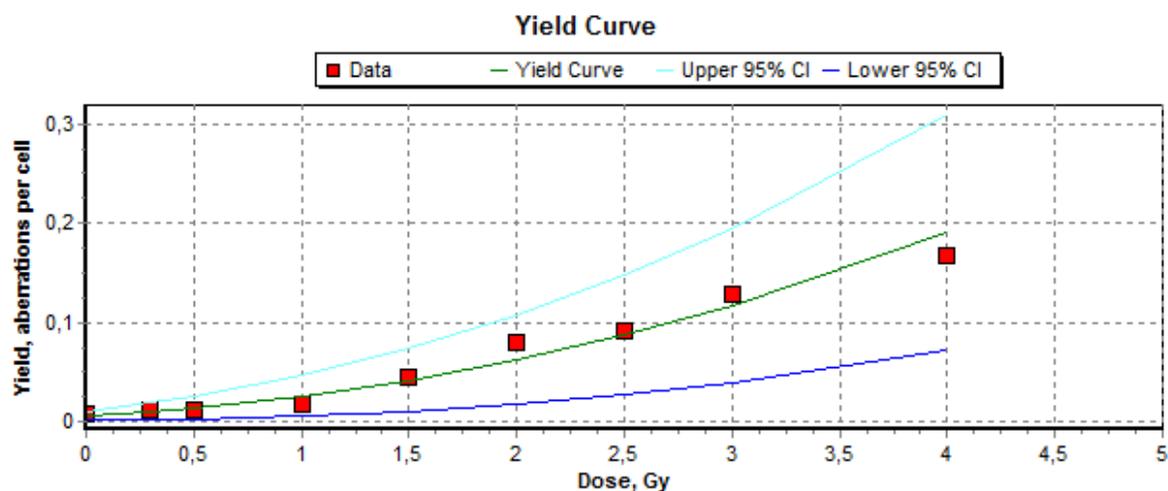


Fig. 2: Curva preliminar de calibración dosis-efecto basada en MN.

$$Y = 0.0058 (+/- 0.0022) + 0.0103 (+/- 0.0061)D + 0.0090 (+/- 0.0022)D^2$$

$$X^2 = 24.4200; \text{g.l.} = 6; p = 0.6668; (\text{z-test}): p_A = 0.0396, p_\alpha = 0.1423, p_\beta = 0.0059$$

(Evaluación realizada por el analista del Laboratorio de Citogenética del INISA y los datos del último conteo en un microscopio de luz)

25 mayo 2020

Consentimiento informado para que el INISA utilice las muestras preparadas de mis linfocitos y los datos obtenidos de mi TFG titulado “Elaboración de la curva preliminar de calibración dosis-efecto utilizando el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis en el laboratorio de citogenética humana del Instituto de Investigaciones en Salud”.

Voluntariamente trabajé con mis propias muestras de sangre, donante femenina, adulta y sana. Esta sangre tuvo valor reactivo y no se realizaron estudios genéticos ni de otro tipo más que el necesario para la elaboración de este TFG. La sangre la utilicé exclusivamente para la irradiación *in vitro* a nueve puntos de dosis con el objetivo de elaborar la curva de calibración dosis efecto para micronúcleos. Las muestras de mi sangre se anonimizaron y se codificaron según el punto de dosis a irradiar.

Una persona capacitada del laboratorio de citogenética del INISA me tomó las nueve muestras de sangre de 5 mL cada una tomadas del antebrazo. Se recolectaron en días diferentes una o dos muestras por día y el procedimiento no duró más de 10 minutos. Posteriormente, la sangre se trasladó al Hospital San Juan de Dios para el procedimiento de irradiación y después la muestra se regresó a INISA en donde se continuó con el proceso correspondiente para determinar los daños cromosómicos causados por la irradiación, calcular las frecuencias y elaborar la curva de calibración utilizando el software Dose Estimate.

De manera voluntaria cedo las muestras preparadas de linfocitos en láminas y los datos que surgieron de este estudio al Instituto de Investigaciones en Salud de la Universidad de Costa Rica para que se complemente con la información de otros donantes en estudios futuros pertinentes a la curva de calibración de micronúcleos.

Bach. Priscilla Redondo Arias
Carné: A75254