

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Efectos cromosómicos producidos por radiación gamma en pacientes sometidos a radioterapia en el Hospital San Juan de Dios.

Tesis para optar al grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética Humana

Claudia Fernández Barrero

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Costa Rica

2017

Miembros del Tribunal y del sustentante

Esta tesis fue aceptada por Tribunal Examinador de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética Humana

Luisa Valle Bourrouet, Licda.

Directora

Vanessa Ramírez Mayorga, Ph. D.

Lectora

Patricia Mora Rodríguez, M. Sc.

Lectora

Wendy Malespin Bendaña, M. Sc.

Miembro del Tribunal

Daniel Briceño Lobo, M. Sc

Presidente del Tribunal

Claudia Fernández Barrero

Sustentante

Dedicatoria

A mi madre por su amor incondicional y apoyo constante

Agradecimientos

A la Dra. Isabel Castro Volio (QEPD), tutora inicial de mi proyecto de graduación, por ser mi primera mentora e introducirme al área de la citogenética, y quien como investigadora principal en su momento del proyecto “Verificación Biológica de la dosis recibida en pacientes tratados con radioterapia del Hospital San Juan de Dios” me permitió realizar este proyecto de graduación desarrollando uno de los objetivos del proyecto.

A William Araya Hidalgo y a Nelson Brenes Obando por toda la ayuda brindada y apoyo técnico para la ejecución de los procedimientos.

Al Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) y a la Sección de Genética, especialmente al laboratorio de Genética Citomolecular por brindarme el apoyo para realizar la investigación en sus instalaciones.

Un agradecimiento especial al Dr. Hugo Recinos Pineda, M. Sc. Marvin Rodríguez González, Diplom. Áurea López Castro del servicio de Radioterapia del Hospital San Juan de Dios por la ayuda logística brindada durante la realización de esta investigación.

Al Dr. Omar García del centro de Protección e Higiene de las Radiaciones (CPHR) de Cuba por toda la ayuda brindada durante toda la investigación, sus enseñanzas y apoyo, es algo por lo que siempre estaré agradecida.

A la M.Sc Wendy Malespín por toda la ayuda brindada para el análisis de los resultados y su correcta interpretación.

Y mi más sincero agradecimiento a la Licda. Luisa Valle y a la Dra. Vanessa Ramírez del Instituto de Investigaciones en Salud y a la M.Sc. Patricia Mora Rodríguez del Centro de Investigación en Ciencias Atómicas, Nucleares y Moleculares (CICANUM) por toda la ayuda brindada durante todo el proceso de investigación y redacción de esta tesis, su ayuda fue de lo más valioso. Gracias.

Índice general

Miembros del Tribunal y del sustentante.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos	iv
Índice general.....	v
Índice de ilustraciones	vii
Índice de cuadros	viii
Lista de abreviaturas	ix
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. SITUACIÓN ACTUAL DE CONOCIMIENTO	5
A. Radiación.....	5
B. Radiación ionizante.....	5
C. Tipos de radiación ionizante:	6
D. Cuantificación de la radiación ionizante (dosis y unidades utilizadas):	7
E. Radiación gamma	8
F. Efecto biológico en el ser humano.....	9
G. Efectos en la salud producidos por radiación ionizante	9
H. Lesiones en el ADN	10
I. Cromosopatías inducidas por radiación ionizante	11
i. Aberraciones inestables:.....	12
ii. Aberraciones estables (OIEA, 2014):.....	13
J. Otros tipos de daños producidos por radiación ionizante	14
Aberraciones de tipo cromatídico:.....	14

K.	Puntos de control del ciclo celular y muerte celular producida por radiación ionizante	15
L.	Epidemiología y etiología del cáncer a nivel mundial y en Costa Rica.	16
M.	Uso de la radiación ionizante en radioterapia	17
	i. Radioterapia:	17
	ii. Tasa de dosis	17
	iii. Fraccionamiento	18
N.	Dosimetría biológica.....	19
	i. Cromosomas dicéntricos:.....	20
IV.	OBJETIVOS	24
	Objetivo general	24
	Objetivos específicos:	24
V.	METODOLOGÍA.....	24
	A. Tipo de estudio	24
	B. Población de estudio.....	25
	C. Muestra en estudio.....	25
	D. Esquema de radioterapia	26
	E. Clasificación del tipo de cáncer.....	27
	D. Recolección de datos.....	27
	F. Análisis estadístico:	30
	i. Cálculo de la dosis absorbida	30
	ii. Cálculo de dosis equivalente de cuerpo entero (DECE)	34
	iii. Análisis de comparación entre antes y después del tratamiento, y análisis de correlación	35
VI.	RESULTADOS	35

Descripción de la muestra de pacientes con cáncer	35
Cromosomopatías encontradas en pacientes sometidos a radioterapia, antes y después del tratamiento con cobalto 60	37
Efecto de la irradiación en pacientes que presenten el mismo tipo de cáncer.	43
Estimación citogenética de la dosis absorbida	45
VII. DISCUSIÓN	51
Cromosomopatías encontradas en pacientes sometidos a radioterapia, antes y después del tratamiento con cobalto 60	51
Bajo recuento mitótico asociado al tratamiento en pacientes con cáncer de mama.....	55
Estimación citogenética de la dosis absorbida	57
VIII. CONCLUSIONES	60
IX. RECOMENDACIONES	61
X. GLOSARIO	62
XI. APÉNDICE	65
Apéndice A: Consentimiento informado brindado, explicado y firmado por los participantes del proyecto.....	65
Apéndice B: Cuestionario realizado a los participantes en la investigación.....	68
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	70

Índice de ilustraciones

Figura 1: Aberraciones inestables producidas por radiación ionizante.....	13
Figura 2: Aberraciones estables producidas por radiación ionizante.....	14
Figura 3: Aberraciones de tipo cromatídico.....	15
Figura 4: Diferenciación por microscopia óptica convencional de la segunda división mitótica (M2) de la primera (M1).....	21
Figura 5: Curva dosis-respuesta proporcionada por el CPHR, con los valores de los coeficientes C, α y β ; proporción de dicéntricos (aberraciones) y número de células analizadas en cada dosis, programa CABAS.....	32
Figura 6: Pantalla del programa CABAS para el cálculo de dosis absorbida en exposición parcial, con su respectivo cálculo de distribución de poisson.....	34
Figura 7: Dicéntricos con su respectivo acéntrico observados en figuras mitóticas analizadas de pacientes sometidos a radioterapia.....	37
Figura 8: Cromosoma en anillo observados en figuras mitóticas analizadas de pacientes sometidos a radioterapia.....	38
Figura 9: Excesos acéntricos observados en figuras mitóticas analizadas de pacientes sometidos a radioterapia.....	38
Figura 10: Fracturas cromatídicas observadas en figuras mitóticas analizadas de pacientes sometidos a radioterapia.....	39
Figura 11: Asociación satelítica observada en figuras mitóticas analizadas de pacientes sometidos a radioterapia.....	40
Figura 12: Anomalía morfológica observada en figuras mitóticas analizadas de pacientes sometidos a radioterapia.....	41

Índice de cuadros

CUADRO 1: Esquema de tratamiento de los nueve participantes en el estudio. Servicio de Radioterapia, Hospital San Juan de Dios.....	26
CUADRO 2: Dosis estimada absorbida según una relación cuadrática de dosis-respuesta....	31
CUADRO 3: Datos sobre sexo, edad, ocupación, tipo de cáncer, información de medicamentos y enfermedades de cada participante en la investigación.....	36
CUADRO 4: Cantidad de las alteraciones morfológicas encontradas en las metafases de los participantes antes y después de la radioterapia con cobalto 60.....	42
CUADRO 5: Comparación de alteraciones morfológicas encontradas en las metafases de cada participante antes y después de la radioterapia con cobalto 60.....	43
CUADRO 6: Frecuencia de alteraciones morfológicas obtenidas en participantes con cáncer de mama después de la radioterapia con cobalto 60.....	44
CUADRO 7: Diagrama de volumen que indica la fracción de dosis irradiada que afecta los órganos cercanos al tumor irradiado con cobalto 60.....	45
CUADRO 7: Características de la irradiación en los pacientes de radioterapia analizados....	46
CUADRO 8: Distribución del número de dicéntricos por célula en los nueve participantes sometidos a radioterapia con cobalto 60.....	46
CUADRO 9: Dosis calculada con el programa CABAS, utilizando metafases de 46 centrómeros y metafases con 45 a 47 centrómeros.....	48
CUADRO 10: Distribución del número de dicéntricos por célula en los nueve participantes sometidos a radioterapia con cobalto 60 tomando en cuenta metafases entre 45 y 47 centrómeros.....	49
CUADRO 11: Cálculo de la dosis de la fracción de células expuesta y porcentaje del cuerpo expuesto calculado con el programa CABAS para los nueve participantes.....	50

Lista de abreviaturas

ace= acéntrico

AM= anomalías morfológicas

as = asociación satelítica

chr = cromosoma

chtb= fractura cromatídica

del= deleción

dic= dicéntrico

dmin=doble minuta

dup= duplicación

i = isocromosoma

inv= inversión

r= anillo

rob= translocación robersoniana

sce= intercambio de cromátidas hermanas

t= translocación

TLE= transferencia libre de energía

RESUMEN

Introducción: Uno de los métodos utilizados para el tratamiento del cáncer es la radioterapia con radiación ionizante como los rayos gamma. La radioterapia además de destruir células cancerosas causa daño a otras células como los linfocitos. La dosimetría citogenética estudia las cromosomopatías producidos por los efectos de las radiaciones ionizantes, calculando la dosis absorbida en un paciente expuesto. Este tipo de investigación y la técnica utilizada es la primera vez que se realiza en Costa Rica, aportando información valiosa para futuros estudios de dosimetría biológica en el país.

Objetivo: Describir los tipos de cromosomopatías inducidas por la radioterapia en pacientes con cáncer tratados en el Hospital San Juan de Dios.

Método: Se analizaron un mínimo de 200 metafases en primera división mitótica, antes y después del tratamiento de radioterapia en nueve participantes, se contabilizó cada tipo de cromosomopatía (dicéntricos, acéntricos, anillos, asociación satelíticas, fracturas cromatídicas y anomalías cromosómicas) utilizando para ello Giemsa en Fluorescencia, se calculó la dosis absorbida utilizando la curva dosis respuesta del Organismo Internacional de Energía Atómica y del Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones de Cuba.

Resultados: Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el número de dicéntricos y en el número de dicéntricos + anillos antes y después del tratamiento, siendo mayor después de la radioterapia. Se obtuvieron dosis menores a la administrada y calculada para la dosis equivalente de cuerpo entero.

Conclusiones: En el presente estudio se logró describir las cromosomopatías inducidas en pacientes con cáncer del Hospital San Juan de Dios (HSJD). Todos los pacientes presentaron el mismo tipo de cromosomopatías. Hay un incremento de dicéntricos y dicentricos+anillos después de la radioterapia, estos resultados son acordes con lo informado con la literatura, confirmando que estos son biomarcadores asociados al efecto de radiaciones ionizantes. La técnica utilizada no es la adecuada para obtener la dosis absorbida real de pacientes con cáncer sometidos a radioterapia.

I. INTRODUCCIÓN

La radiación ionizante es un proceso en el cual partículas emitidas por elementos radiactivos, son capaces de depositar energía suficiente para desplazar electrones de los átomos, por lo que rompen los enlaces químicos y provocan otros cambios moleculares que dañan a las células afectadas (Organización Internacional del Trabajo (OIT), 2001). Todos los organismos vivos estamos continuamente expuestos a este tipo de radiación ya sea por fuentes naturales o por fuentes artificiales como las utilizadas para radioterapia que utiliza radiación gamma. Su uso ayuda a mejorar la calidad de vida y ayudan a la sociedad de muchas maneras, pero siempre se debe tener en cuenta los beneficios y los riesgos a su exposición en el ser humano, ya que pueden producir cromosomopatías (OIT, 2001; Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), 2014).

Todos los tipos de radiaciones ionizantes, incluyendo la radiación con rayos gamma inducen a cromosomopatías. No obstante, la frecuencia de cada tipo de alteración citogenética y su distribución por célula depende de la dosis, la sensibilidad del paciente y del tipo de célula que va a ser sometida a la irradiación (López, Sáenz y Ruíz 2008; International Atomic Energy Agency (IAEA), 2004). Las células varían su sensibilidad a la radiación, por lo que células de diferentes órganos tienden a comportarse de manera diferente al ser expuestas a radiación. Por ejemplo, algunos tipos de linfocitos y células germinales tienden a ser muy sensibles a la radiación, y en la mayoría de los casos la exposición a ésta provoca apoptosis. En contraste, muchas células no divisorias en órganos y otras estructuras no responden a la exposición, hasta que son inducidas a dividirse. Además, la radiosensibilidad del órgano irradiado, o incluso tratamientos previos a la radioterapia puede provocar variación en la cuantificación de cromosomopatías (del Cura, Pedraza, y Gayete, 2009; IAEA, 2004).

La radioterapia generalmente utiliza radiación ionizante de baja transferencia lineal de energía (TLE) como son los rayos gamma y rayos X, ésta genera en los pacientes sometidos a ella, cromosomopatías inestables (IAEA, 2011; López *et al.*, 2008); por lo que se espera que un paciente que inicia un tratamiento con radioterapia no presente aberraciones inestables antes del tratamiento, a menos que haya estado en un esquema de tratamiento con radioterapia

previamente, debido a que las aberraciones inestables desaparecen con el tiempo (Gershkevitsh *et al.*, 2002).

Aunque las cromosomopatías inducidas por la radiación ionizante (en este caso rayos gamma) desaparecen o son reparadas con el tiempo, y la radioterapia destruye las células cancerosas, diversos estudios informaron una clara relación en la aparición de un segundo cáncer en pacientes después de haber sido tratados con radioterapia (Kirova *et al.*, 2005; Hall y Wu, 2001; Roychoudhuri, Evans, Robinson, y Moller, 2004; Travis *et al.*, 2000; Brenner, Curtis, Hall, y Ron, 2000). En la mayoría de casos se observan apariciones de tumores en tejidos radiosensibles como médula ósea (leucemias) después de 1 a 5 años de terminado el tratamiento con radioterapia (Roychoudhuri *et al.*, 2004; Travis *et al.*, 2000). La aparición de un cáncer secundario es mayor en pacientes tratados con radioterapia que tratados con cirugía (Brenner *et al.*, 2000).

Según la International Agency for Research on Cancer (IARC), de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el 2012 se reportaron 14,1 millones de nuevos casos de cáncer, 8,2 millones de muertes por cáncer y para ese año 32,6 millones de personas vivían con cáncer a nivel mundial. En Costa Rica, se informaron 8 900 casos nuevos de cáncer en el 2012; y se calcula que el 18,2 % de la población está en riesgo de desarrollar cáncer antes de los 75 años, lo que quiere decir que 872 326 personas, del total de la población costarricense (4 793 000 millones) puede llegar a padecer de cáncer antes de los 75 años (IARC, 2014).

Según el Informe Institucional sobre el cáncer en Costa Rica (2001) realizada por la Caja Costarricense del Seguro Social, de los 5 000 casos nuevos de cáncer que se informan al año, 2 000 son sensibles a radioterapia, y de estos, alrededor de 700 (14%) son tratados con ella. Este valor crece con el tiempo; para el 2014 se informaron el doble de nuevos casos 10 906, y siguiendo el patrón del 2001, se espera que aumente el número de pacientes tratados con este método de radiación (INEC, 2016).

En Costa Rica no existe ningún estudio registrado en el campo de la dosimetría para radiaciones ionizantes, utilizando la citogenética ni ningún otro marcador biológico. En 1996 ocurrió un accidente en el hospital San Juan de Dios, donde se sobreirradiaron 115 pacientes con cáncer, de los cuales se estima que 17 murieron en los dos años siguientes por causa de la sobreirradiación con cobalto (IAEA, 1998). Es por ello que existe la necesidad de realizar

investigación en el campo de la dosimetría biológica, con el fin de entender mejor el comportamiento de las cromosomopatías producto de la radiación parcial *in vivo* en la población costarricense, además de realizar ensayos de cálculo de dosis absorbida utilizando sangre periférica, para tener el conocimiento de la técnica y conocer su utilidad como marcador biológico para su uso en caso de accidente, de monitoreo y en futuras investigaciones en el área de la biodosimetría. En los casos en los que la dosis detectada por este medio es baja (menor a 50 mGy) esto permitiría tranquilizar a las personas ya que es muy probable que no tengan graves secuelas por la exposición a la radiación; en los casos en los que la dosis detectada sea muy alta, le permite al médico explicar a la persona acerca del riesgo de desarrollar enfermedades tales como un cáncer secundario (OIEA, 2014, Castro-Volio, 2013).

Este trabajo pretende describir los efectos a nivel cromosómico provocados por radiación gamma, en pacientes sometidos a un esquema de tratamiento con radioterapia en el Servicio de Radioterapia del Hospital San Juan de Dios, y determinar la dosis absorbida por cada paciente utilizando la curva dosis-respuesta del OIEA así como la del Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones de Cuba (CPHR) para así ensayar en Costa Rica por primera vez las herramientas biodosimétricas desarrolladas para el ensayo dicéntrico ante exposiciones parciales. Se espera observar aberraciones inestables de tipo cromosomas dicéntricos y fragmentos acéntricos, también cromosomas en anillos céntricos y fragmentos acéntricos producto de la radiación gamma; además de estimar la dosis de radiación absorbida por los pacientes y compararla con la suministrada durante la radioterapia. La técnica de siembra, cosecha y tinción utilizadas en este proyecto de tesis se implementó en el laboratorio de genética citomolecular para investigaciones en el ámbito de la dosimetría biológica.

II. SITUACIÓN ACTUAL DE CONOCIMIENTO

A. Radiación

La radiación es la energía emitida y transferida en el espacio. La radiación producida por un espectro de luz, que es irradiado hacia un cuerpo se le denomina radiación electromagnética. La materia que intercepta la radiación y absorbe una parte o la totalidad de ella se le denomina materia expuesta o irradiada (Bushong, 2013).

La radiación electromagnética está compuesta por las ondas de radio, microondas, luz visible, luz ultravioleta, rayos X y rayos gamma (γ). Estas ondas se diferencian esencialmente por su energía que varía inversamente con la longitud de onda (IAEA, 2010). Este tipo de radiación se puede clasificar en dos tipos: radiaciones no ionizantes y radiaciones ionizantes, su clasificación depende de la longitud de onda, y su efecto en las células depende de su intensidad y duración. Las radiaciones no ionizantes poseen una longitud de onda larga, superior a 1 nm. En este grupo se encuentran la luz visible y las ondas microondas; la energía de sus fotones está muy por debajo de la necesaria para romper enlaces químicos. Lo contrario sucede con las radiaciones ionizantes, éstas se caracterizan por poseer una longitud de onda corta, menor de 1 nm, y provocan la liberación de un electrón de un átomo o una molécula, por lo que transportan mayor energía. En este grupo se encuentran los rayos X y los rayos gamma (γ) (Tortora, Funke y Case, 2007; Aguilar-Gutiérrez, 2001).

B. Radiación ionizante

La radiación ionizante es un proceso en el cual los fotones o partículas emitidas por elementos radiactivos o en procesos atómicos, son capaces de depositar energía suficiente para desplazar electrones de los átomos hacia los que llegan e interactúan, por lo que rompen los enlaces químicos y provocan otros cambios moleculares que dañan a las células afectadas (OIT, 2001). Pueden ser emitidos por procesos de inestabilidad de núcleos o por des-excitación de los átomos y su núcleo en reactores nucleares, máquinas de rayos X, ciclotrones, entre otros equipos (IAEA, 2010).

Todos los organismos vivos estamos continuamente expuestos a este tipo de radiación. Más del 90% de la exposición a radiación ocurre por fuentes naturales, como por ejemplo: rayos cósmicos, emisiones de radón radiactivo, fuentes provenientes de la corteza terrestre, aire,

comida, agua y del cuerpo de los seres vivos. Es inevitable que los isótopos radiactivos que se originan de forma natural entren y permanezcan en todos los seres vivos, sin embargo, cuando se absorben en dosis pequeñas el organismo puede soportarlos y controlarlos sin efectos secundarios (Bushong, 2013; IAEA, 2010; IAEA, 2011).

Las exposiciones a radiación originadas artificialmente (producidas por el hombre) ocurren principalmente para propósitos médicos (rayos X y gamma, medicina nuclear, radioterapia, radiofármacos), generación de electricidad (uranio radiactivo), usos industriales (registro de pozos petroleros), entre otros. Su uso ayuda a mejorar la calidad de vida y ayudan a la sociedad de muchas maneras. Pero siempre se deben sopesar los beneficios de cada uso con sus riesgos, ya que exposiciones prolongadas a altos niveles de radiación, aumenta la probabilidad de un efecto perjudicial para el ser humano y su ambiente (IAEA, 2010; OIT, 2001).

C. Tipos de radiación ionizante:

La radiación ionizante se puede dividir en dos tipos: ionización directa e indirecta. La mayoría de las partículas radiactivas son del primer tipo, estas partículas pueden perturbar directamente la estructura atómica de lo que se encuentren a su paso, provocando daños a nivel biológico y químico en las moléculas cercanas. En el caso de las ionizaciones indirectas, el daño no es dado directamente por la partícula radiactiva, sino que es por efecto de electrones secundarios generados después de la absorción de energía de la materia expuesta (IAEA, 2010; Obe y Vijayalaxmi, 2007). En este grupo encontramos los rayos X y γ .

La radiación ionizante induce una serie de reacciones de radicales libres, que eventualmente producen mutación y muerte celular (Obe y Vijayalaxmi, 2007). Toda molécula dentro de la célula puede ser perjudicada por una radiación ionizante, incluido el ácido desoxirribonucleico (ADN).

Cuando una radiación ionizante atraviesa la materia, comienza a perder energía a través del recorrido, producto de diversos procesos de interacción a lo largo de su camino. Esta pérdida depende del tipo de radiación y de la densidad del material que atraviesa. Este promedio o densidad de energía transferida a un tejido se le conoce como transferencia lineal de energía (TLE) (IAEA, 2010).

Existen dos tipos de radiaciones; de baja TLE y de alta TLE. Las primeras realizan una deposición de energía dispersa entre las células, por lo que hay una gran probabilidad de que cualquier daño en la célula se convierta en una aberración, pero las aberraciones son aleatorias entre células. Este tipo de radiación de baja TLE incluye los rayos γ (utilizado en la radioterapia) y los X. El segundo tipo, las de alta TLE (partículas alfa o el acelerador de neutrones), interaccionan densamente con el medio, por lo que inducen más ionizaciones y son más concentradas en unas células que en otras. Estas últimas también tienen la habilidad de producir una gran cantidad de aberraciones que por el tipo de daño a la doble hebra de ADN es más difícil de reparar que las de baja TLE (OIEA 2014; IAEA 2010).

D. Cuantificación de la radiación ionizante (dosis y unidades utilizadas):

Los cambios bioquímicos producidos por la radiación ionizante son los eventos fundamentales que producen daño al material biológico. Según la IAEA (2010), la radiación causante de un daño biológico puede ser cuantificada por medio de medidas de:

- 1) Exposición: se basa en la cuantificación de la radiación con base a la habilidad de ésta para producir ionización en el aire con una temperatura y presión estándar; se puede medir con detectores de radiación, por ejemplo, el aparato Geiger-Muller y su unidad es Culombio/kilogramo (C/kg).
- 2) Dosis absorbida (Dt): cantidad de energía (Julios) de radiación ionizante depositada por unidad de masa de material irradiado y cuya unidad en el Sistema Internacional es el Gray (Gy; $1\text{Gy} = 1\text{J/kg}$).
- 3) Dosis equivalente (Ht): es utilizada para comparar la efectividad biológica a diferentes tipos de radiación en un tejido, se mide en sievert (Sv) y es el producto de Dt en un tejido multiplicado por el factor de ponderación de radiación (w_r).
- 4) Dosis efectiva (E): es utilizada para estimar el riesgo de radiación en seres humanos, se mide también en sieverts.
- 5) Dosis colectiva: es la dosis recibida por persona multiplicada por el número de personas expuestas al año.

Esta última medida se utiliza para propósitos de protección y cálculos de respuesta en caso de un accidente radiológico (IAEA, 2010).

E. Radiación gamma

Es un tipo de radiación electromagnética, indirectamente ionizante y de baja TLE. Se emite por elementos radiactivos (cobalto, uranio, entre otros) o procesos subatómicos. Es el tipo de radiación más penetrante.

Presenta tres efectos cuando interactúa con la materia:

1. Absorción fotoeléctrica: ocurre cuando un fotón interactúa con un electrón fuertemente ligado al átomo, le transfiere toda su energía y expulsa al electrón del medio. El fotón incidente desaparece y la energía transferida se utiliza para superar la energía de unión del electrón, y el resto aparece como energía cinética de los fotoelectrones resultantes; de esta manera toda la energía de los fotones incidentes se deposita en el tejido irradiado. El efecto fotoeléctrico es el mecanismo de transferencia de energía dominante en la radiación gamma en energías cercanas a los 50 keV (kilo electronvoltios) en tejidos biológicos (IAEA, 2010).

2. Efecto Compton: ocurre cuando el fotón incidente interactúa con el electrón del orbital exterior, cuya energía de enlace o unión es baja comparada con la del fotón incidente. En este caso el fotón incidente transfiere su energía al electrón, causando su expulsión del átomo. El fotón se dispersa en una dirección diferente a la de la energía incidente. Este efecto se produce en radiación gamma en un ámbito de energía intermedia (100 keV-10 MeV), el cual es el ámbito de radiación terapéutica (IAEA, 2010).

3. Producción de pares: se da cuando un fotón de alta energía (mayor a 1,02 MeV) interactúa con los átomos, el fotón incidente se puede convertir espontáneamente en la masa de un par de electrones y positrones por la interacción de la fuerza de Coulomb en la vecindad del núcleo. Las partículas con cargas opuestas se emiten en direcciones opuestas entre sí y causan daños como partículas de carga secundarias. La energía del equivalente a la masa en reposo de las dos partículas aparece como energía cinética del par y del núcleo (IAEA, 2010).

La gran penetrancia de los rayos gamma los hace útiles en procesos médicos, como son las tomografías y la medicina nuclear. Sin embargo, por su condición de radiación ionizante, generan cambios moleculares que pueden repercutir en daños en el ADN y en efectos cancerígenos (IAEA, 2010).

F. Efecto biológico en el ser humano

El efecto producido por la radiación ionizante en la célula dependerá de la dosis absorbida y del tiempo de exposición, para que sea de efecto inmediato o de efecto retardado. Sus efectos se pueden dividir en:

1. Reacciones tisulares nocivas (efecto determinista) producto de la muerte o defectos en el funcionamiento de las células tras dosis elevadas.
2. Cáncer y efectos heredables (efecto estocástico) que se explicará más adelante (Streffer, 2007).

El primero necesita una dosis umbral para su aparición, y su gravedad aumenta con la dosis recibida (del Cura *et al.*, 2009; Prieto, Moreno, Nava, Zapata, y Herranz, 2007). El segundo no tiene un umbral, su gravedad es independiente de la dosis absorbida, y su probabilidad de aparición aumenta con la dosis absorbida (OIT, 2001).

Los efectos deterministas y estocásticos difieren en órganos y sistemas del cuerpo humano:

- Los deterministas tienden a producir reacciones precoces en la piel, como eritemas, opacidad del cristalino, muerte por apoptosis de linfocitos, sobre todo de los linfocitos B, efectos en la espermatogénesis, entre otros. Lo anterior depende de la dosis recibida.
- Los efectos estocásticos se dividen en dos tipos: efectos somáticos, si la célula afectada es somática, en este caso es muy probable el desarrollo de cáncer; y efectos hereditarios, si la célula afectada es germinal, por lo que los efectos de la radiación no los manifestará el individuo expuesto, sino su descendencia (del Cura *et al.*, 2009).

Se debe tomar en cuenta que la gravedad del daño producido dependerá de la relevancia biológica de la célula afectada (Prieto *et al.* 2007). Por lo tanto, la respuesta a la radiación del órgano dependerá de los tejidos que los componen (García, Lamadrid, Morera, y Mandina, 2005).

G. Efectos en la salud producidos por radiación ionizante

En un ser vivo, los efectos en la salud dependen del área corporal que es expuesta a la radiación y de la distribución de la dosis al que fue expuesto el organismo. El efecto sobre los diferentes tipos de células, tejidos u órganos dependerá de su radiosensibilidad. Para saber el nivel de radiosensibilidad se siguen las leyes de Begornie y Tribondeau, postuladas en 1906,

que indican que una célula es más radiosensible cuando su actividad reproductiva es alta, el período de fase mitótica es más largo, y está menos diferenciada (Prasad, 1995).

Utilizando estos criterios se puede decir que, células con rápida división celular, como por ejemplo, médula ósea, gónadas y mucosa gastrointestinal, son más radiosensibles. Por el contrario, el tejido óseo y el muscular presentan menos divisiones mitóticas, por lo que son menos radiosensibles. Existen dos excepciones a esta regla: los linfocitos periféricos y los oocitos en mamíferos, los cuales son altamente radiosensibles, aun cuando no tienen alta división celular o diferenciación (Galle y Paulin 2003; Kedar, 1995).

El daño producido además dependerá de la cantidad de energía absorbida por un tejido vivo (dosis). Una radiación que sea homogénea en el cuerpo, de 100 Gy, causa la muerte en unas horas o días. Dosis entre 10 y 50 Gy causan la muerte por consecuencia de lesiones gastrointestinales en un plazo de una a dos semanas. Dosis entre 3 y 5 Gy causan un 50% de fallecimientos por lesiones en la médula ósea en un lapso de uno a dos meses. En dosis entre 1 a 3 Gy producen anorexia, malestar general, diarrea, eritema cutáneo, inhibición transitoria de la producción de espermatozoides y mortalidad entre 5~10% por sobreinfección. Y a dosis de 1 Gy produce malformaciones fetales por exposición de la embarazada, disminución número de espermatozoides, alteraciones gastrointestinales, pérdida de apetito, náuseas, disminución de número de linfocitos y neutrófilos, náuseas, fatiga y vómitos como efecto inmediato. (Aguilar-Gutiérrez, 2001; OIT, 2001).

H. Lesiones en el ADN

Cuando la radiación ionizante es absorbida por una célula, una fracción de la energía es absorbida en el ADN y en el líquido circundante, esto produce una serie de reacciones con radicales libres que desatan daños a nivel de mutación y muerte celular (Obe y Vijayaxmi, 2007). La exposición a la radiación ionizante induce en el ADN roturas y daños. Existen diversos tipos de lesiones: rotura de una hebra de la doble hélice, rotura de las dos hebras de la hélice, uniones cruzadas ADN-proteína, uniones cruzadas inter- o intra-hélice, lesión a una base nitrogenada, pérdida de una base nitrogenada, puntos carentes de bases, entrecruzamiento entre el ADN, roturas monocaternarias y bicaternarias, entre otras (OIEA, 2014; Prieto *et al.* 2007).

En el caso de la radiación ionizante de baja TLE (rayos X y γ) se puede producir racimos de ionizaciones de forma localizada a lo largo de la trayectoria de un electrón, mientras que la radiación de alta TLE produce un número algo mayor de ionizaciones, próximas y cercanas entre sí. En el material biológico expuesto a rayos gamma, los radicales formados por la radiólisis del agua, reaccionan en las inmediaciones de una región discreta y localizada del ADN, lo que provoca las lesiones anteriormente mencionadas, sobretodo lesiones múltiples en un mismo sitio (MDS, siglas en inglés de *multiple-deletion series*) y lesiones del ADN arracimadas. Las lesiones MDS producidas en el ADN pueden causar roturas que pueden ser reparadas con facilidad por el sistema de reparación del ciclo celular. Pero las lesiones arracimadas, pueden ser más difíciles de reparar, o pueden no ser reparables y resultan en muchos casos en cromosomopatías letales (OIEA, 2014; Rydberg, 2001).

Cuando se produce una lesión celular, existen diversos mecanismos de reparación en el ciclo celular (puntos de control) y vías de reparación. Los daños en pares de bases y roturas monocaternarias se reparan mediante la escisión de pares de bases (EPB), escisión de nucleótidos (ESN) y reparación de las roturas monocaternarias (RRMC). Los daños a nivel de proteína se reparan mediante ESN y recombinaciones homólogas (RH). Las roturas bicaternarias utilizan el mecanismo de reparación RH y la unión de los extremos no homólogos, que funcionan en el caso del primero durante todo el ciclo celular, y en el segundo levemente en G1 y en mayor nivel en G2. En caso de que el mecanismo de reparación no funcione, se producen lesiones críticas, que ocasionan cromosomopatías tales como los dicéntricos o las translocaciones (OIEA, 2014; Jeggo y Lobrich, 2006).

I. Cromosomopatías inducidas por radiación ionizante

Las cromosomopatías inducidas por radiación ionizante pueden ser de tipo cromosómico si el daño ocurre cuando la célula está en G0, es decir, que implican ambas cromátidas de un cromosoma; o de tipo cromatídicos, o sea, que afecta solo una cromátida, si las células del paciente se encontraban en fase G2 cuando este estuvo expuesto. Sin embargo, no se puede descartar estos mismos efectos en pacientes que estuvieron expuestos a radiación ultravioleta o clastógenos químicos (OIEA, 2014).

Existen dos tipos de cromosomopatías dadas por radiación ionizante, las aberraciones inestables, que dificultan la división celular, por lo que los sistemas de reparación enzimática tienden a corregirlos o eliminarlos de la célula; y las aberraciones estables, donde sus estructuras persisten en sucesivas divisiones celulares (Prieto *et al.*, 2007). A continuación, se detallan los dos tipos de aberraciones:

i. Aberraciones inestables:

Son aberraciones asimétricas que dificultan la división celular y por lo tanto tienden a perderse en los procesos de mitosis (Obe y Vijayalaxmi, 2007). En éstas se encuentran los cromosomas dicéntricos, anillos céntricos, fragmentos acéntricos.

Según el libro: “Dosimetría citogenética: Aplicaciones en materia de preparación y respuesta a las emergencias radiológicas” (2014) y el artículo: “Relationship between radiation induced dicentric chromosome aberrations and micronucleus formation in human lymphocytes” (2007), las aberraciones inestables se definen como se muestra a continuación:

- **Dicéntricos (dic):** Es la unión entre las piezas centroméricas de dos cromosomas rotos, acompañado por un fragmento acéntrico compuesto por la unión de las piezas acéntricas de los cromosomas implicados. A dosis altas, superior a 2,0 Gy se pueden formar tricéntricos y cuadricéntricos (figura 1A).
- **Fragmento acéntrico (ace):** son formados independientemente de los dicéntricos y los anillos céntricos, se conocen generalmente como exceso acéntrico. Pueden ser causados por deleciones terminales o intersticiales de diferentes tamaños, aunque no siempre es posible determinar su origen. Se cuentan como excesos acéntricos a anillos acéntricos y dobles minutas. Se han observado desde una dosis de 1,0 Gy, y su probabilidad de aparición aumenta con la dosis (figura 1B).
- **Micronúcleos (MN):** se forman a partir de los fragmentos acéntricos y de los cromosomas completos que se separan durante la mitosis y son incapaces de unirse a alguna de las células hijas. Permanecen en el citoplasma celular. Se utiliza para evaluar el efecto genotóxico de agentes ambientales, como la radiación ionizante. Su número se relaciona con la dosis de exposición (figura 1C).

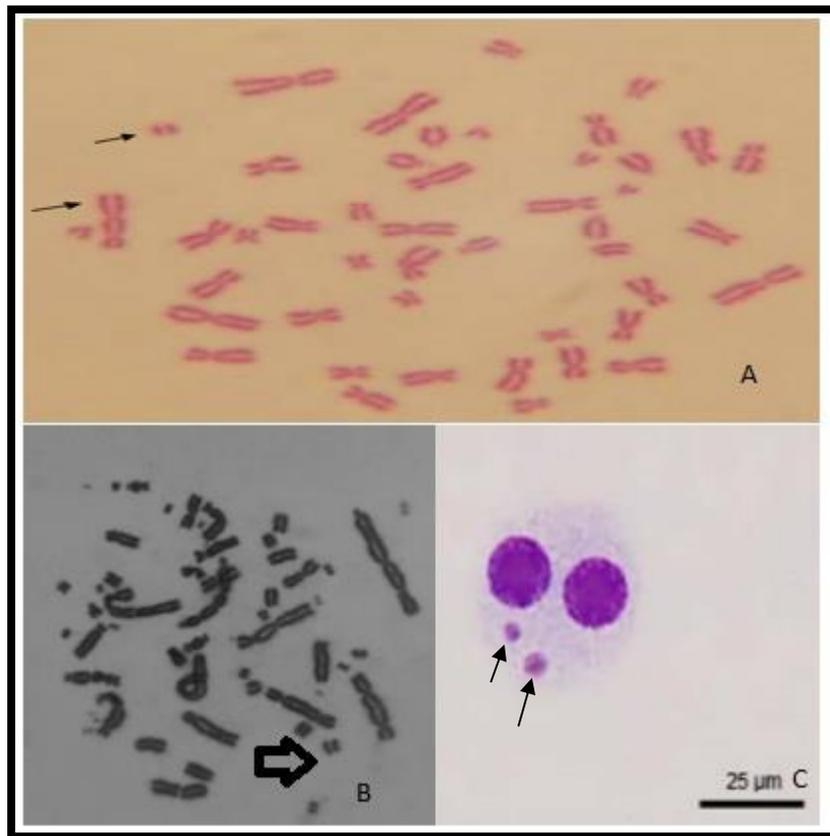


Figura 1: Aberraciones inestables producidas por radiación ionizante (señaladas por las flechas). A) Cromosoma dicéntrico con su respectivo acéntrico. B) Excesos acéntricos, C) Micronúcleos (OIEA, 2014).

ii. Aberraciones estables (OIEA, 2014):

- Translocación recíproca: es el intercambio de porciones terminales de dos cromosomas no homólogos. Las translocaciones se observan comúnmente utilizando bandeado G, pero en casos de dosimetría biológica, el procedimiento es demasiado laborioso. Con únicamente bandeado G, no es muy probable encontrar translocaciones. En dosimetría para realizar análisis por translocaciones se utiliza la técnica llamada hibridación *in situ* fluorescente o FISH (figura 2A).
- Translocación no recíproca: (Inserciones) corresponde a fragmentos acéntricos que son insertados en uno de los brazos de un cromosoma (figura 2B).

- Anillo (r) céntrico: es la unión entre las roturas en los brazos separados del mismo cromosoma y también es acompañada por un fragmento acéntrico (figura 2C).

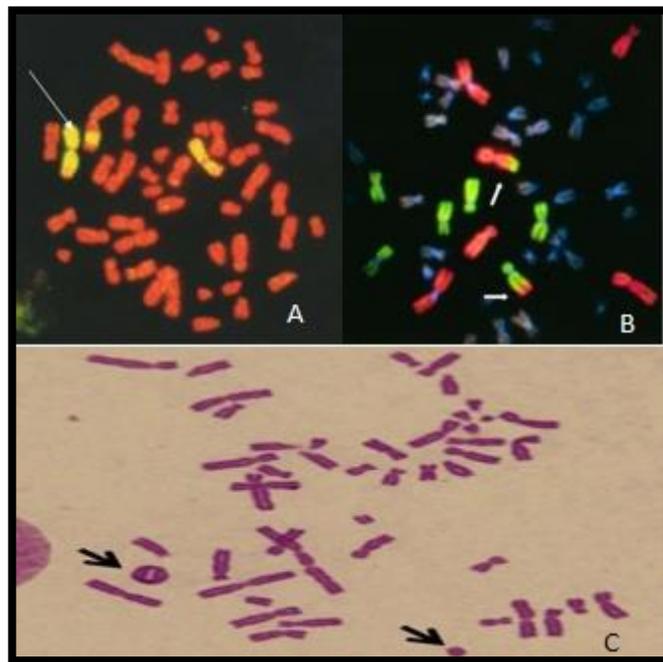


Figura 2: Aberraciones estables producidas por radiación ionizante. A) Inserción de un fragmento del cromosoma 1 en otro cromosoma, el cromosoma 1 ha sido pintado de amarillo y todos los demás con yoduro de propidio. B) Translocación recíproca por medio de la técnica FISH. La translocación se observa en los cromosomas bicolors (flecha) que han intercambiado segmentos en los extremos de sus brazos largos. C) Anillo acéntrico con su respectivo fragmento céntrico (flechas) (OIEA, 2014).

J. Otros tipos de daños producidos por radiación ionizante

Aberraciones de tipo cromatídico:

Son producidas por lesiones acaecidas después de la fase de síntesis del ciclo celular (en G2 del ciclo celular), el daño se observa en la cromátida afectada y no en todo el cromosoma (Prieto *et al*, 2007).



Figura 3: Aberraciones de tipo cromatídico (indicadas con flechas)(OIEA, 2014)

K. Puntos de control del ciclo celular y muerte celular producida por radiación ionizante

Cuando la célula presenta un daño a nivel de ADN, ésta puede tratar de repararlo retrasando la división celular o morir si el daño es irreparable (apoptosis). La respuesta que se va a presentar debido a la radiación recibida, dependerá del tipo de célula, la fase del ciclo celular en que se da el daño, el grado del daño y la integridad de las vías que gobiernan esta respuesta (IAEA, 2010; Söderlund, 2009).

En tejidos normales las células se renuevan constantemente, hay un balance entre la proliferación, crecimiento y diferenciación celular, y la pérdida de células maduras por apoptosis (IAEA, 2010). Una respuesta común a los agentes que dañan el ADN, es la detención del ciclo celular debido a la activación de puntos de control del mismo, los cuales actúan como barreras para evitar la propagación de las células con un genoma dañado. Los puntos de control en G2 e inicio de mitosis son importantes en la respuesta a la radiación ionizante. La cinasa ataxia-telangiectasia mutada (ATM) es el iniciador proximal de la transducción de la señal a la maquinaria del ciclo celular después del daño en el ADN por radiación ionizante. Cuando una célula se expone a radiación ionizante, la ATM se activa rápidamente fosforilando numerosas dianas moleculares, como por ejemplo P53, MDM, NBS1; al ser fosforiladas, éstas bloquean la progresión del ciclo celular y permiten que la célula intente reparar los daños en el ADN. La

detención del ciclo celular puede llegar a ser prolongada y llevar a la senescencia o a la muerte de la célula (Söderlund, 2009).

La radiación ionizante también induce muerte celular por medio de muerte por catástrofe mitótica; se cree que ésta es el principal mecanismo por el cual los tumores sólidos son eliminados por radioterapia. Se produce durante la mitosis, o después de varias divisiones celulares posteriores a la exposición a la radiación ionizante. Este modo de muerte celular es dado por el fallo para reparar completamente o con precisión el daño del ADN. Además, los intentos de entrar en mitosis antes de finalizar la replicación del ADN en fase S pueden resultar también en catástrofe mitótica. La maquinaria apoptótica se activa para ejecutar la catástrofe mitótica, e implica la activación de las caspasas-2, -3 y -9 (IAEA, 2010; Söderlund, 2009).

L. Epidemiología y etiología del cáncer a nivel mundial y en Costa Rica.

Para el año 2000, se informaron en el mundo más de 19 millones de casos nuevos de cáncer y alrededor de 12 millones de muertes causados por ella (Granados y Herrera, 2010). En el 2012, según la IARC (2014), se reportaron 14,1 millones de nuevos casos de cáncer; 8,2 millones de muertes por cáncer y para ese año 32,6 millones de personas vivían con cáncer a nivel mundial. Solo en Centroamérica se informan 197 mil casos por año y 110 mil muertes por cáncer, donde el más frecuente es el de próstata en el caso de hombres y de mama en mujeres, seguido por el gástrico y el de colon (IARC, 2014).

La mortalidad por cáncer en los países en vías de desarrollo tiende a presentar un patrón ascendente. En el caso de Costa Rica, según la IARC (2014), se diagnosticaron 8 900 casos nuevos de cáncer, de los cuales 4 600 fueron en hombres y 4 400 mujeres. Los tipos de cáncer más comunes siguen el mismo patrón que el presentado para Centroamérica.

El cáncer es un proceso que requiere múltiples alteraciones genéticas durante largos periodos. Se debe tomar en cuenta la susceptibilidad a los carcinógenos, la inmunosupresión y la comorbilidad, para explicar la tendencia creciente en el número de casos reportados. La incidencia del cáncer varía según la edad, género, grupo étnico, país y región. Un factor importante en el índice de crecimiento de cáncer es el envejecimiento, debido al desgaste en salud acumulado por años, que hace que aparezcan enfermedades crónicas como cáncer (Granados y Herrera, 2010; Casciato y Territo, 2009).

M. Uso de la radiación ionizante en radioterapia

i. Radioterapia:

Se define como radioterapia al uso de radiación ionizante para destruir células cancerosas. Por lo general se utiliza una fuente externa que dirige un haz de radiación a un volumen específico del tumor. Ese haz de radiación deposita energía en un tejido determinado y mata a las células expuestas en ese volumen; por lo tanto, los efectos de la radiación se limitan a los tejidos y órganos expuestos al haz (IAEA, 2004).

Una fuente de radioterapia externa puede ser un dispositivo eléctrico, el cual emite radiación sólo cuando la electricidad está activada, además puede ser generada por una sustancia radiactiva, como por ejemplo el cobalto, o por un acelerador de partículas atómicas, que dirige la radiación al tumor, mientras se blindo el tejido sano para protegerlo (Merck Sharp y Dohme, 2010). Incluso la mejor radioterapia no puede destruir un tumor sin causar algún daño a los tejidos normales que estén en el haz de energía, sobre todo aquellos en los que las células normalmente se dividen con rapidez, como piel, médula ósea, folículos pilosos, revestimiento de boca. La experiencia ha demostrado que si el tratamiento no daña el tejido sano hasta cierta medida, habría muy pocos tumores curados (IAEA, 2004).

ii. Tasa de dosis

Es la dosis que se administra por unidad de tiempo, se expresa por lo general en centigrays por minuto (cGy /min). La dosis de radiación administrada depende de si la terapia está destinada a ser curativa o paliativa, también depende del volumen de tejido que será irradiado y la toxicidad de los tejidos normales circundantes, incluyendo factores como la condición del paciente: edad y problemas de salud que podrían aumentar los efectos secundarios de la radioterapia, tales como trastornos del tejido conjuntivo tipo esclerodemia (IAEA, 2010). Por lo general en radioterapia externa la tasa de dosis es entre 75 y 120 cGy/min, tomando en cuenta los factores mencionados, como la condición del paciente (Granados y Herrera, 2010). Una dosis administrada toma en cuenta la tasa con que se administra; si se disminuye la tasa de dosis, la supervivencia celular aumenta, debido a reparación de lesiones subletales y repoblación celular (Casciato y Territo, 2009).

iii. Fraccionamiento

El fraccionamiento es la administración de la radiación en varias sesiones y permite la reparación de lesiones que pueden llegar a ser letales o potencialmente letales, la restauración de sistemas de reparación entre las sesiones de radioterapia y la preservación en su mayoría a los tejidos sanos.

Existen cuatro tipos de fraccionamiento:

- 1) Radioterapia clásica: en la que la dosis por sesión administrada es entre 1,6 y 2,5 Gy por día, de 4 a 5 veces a la semana, hasta completar la dosis total necesaria.
- 2) Radioterapia hiperfraccionada: en la cual se realizan varias sesiones en un mismo día, durante varios días, utilizando dosis entre 0,8 y 1,5 Gy; debe existir un intervalo de cuatro a ocho horas entre cada sesión. Se utiliza para aumentar la destrucción de células tumorales y se mantiene el mismo grado de lesión tardía sobre tejidos sanos.
- 3) Hiperfraccionamiento acelerado: consiste en administrar una dosis total más elevada que la de hiperfraccionamiento de dos a tres veces al día. Se utiliza para superar la acelerada repoblación de células neoplásicas.
- 4) Hipofraccionamiento: se aplica la radiación ionizante en un número reducido de sesiones y con una dosis mayor que la radioterapia convencional (Granados y Herrera, 2010; Casciato y Territo, 2009).

Existen individuos que presentan mayor radiosensibilidad que desencadenan efectos indeseables, como la aparición de tumores secundarios. Por lo tanto, las dosis de radiación están restringidas a fin de minimizar la incidencia de dichos efectos secundarios en el tratamiento del cáncer. Por esta razón, en radiobiología se intenta identificar predictores de radiosensibilidad antes del tratamiento con el fin de permitir la individualización de la radioterapia, optimizando así las tasas de control tumoral y reducción de los efectos graves de la radioterapia. Para ello se puede utilizar la frecuencia de cromosomopatía, ya que normalmente está relacionada con una función de reparación del ADN alterado, la cual a su vez está vinculado a la radiosensibilidad celular por la disfunción de las proteínas de reparación (IAEA, 2014; Huber *et al.*, 2011).

N. Dosimetría biológica

La radiación ionizante puede ser medida por dosímetros físicos, pero en los casos en que haya una exposición a radiación y no exista un dosímetro físico para estimar la dosis de radiación recibida por un individuo, se puede recurrir al estudio de los daños biológicos producidos por la radiación en las personas expuestas a ella, para determinar la dosis absorbida y así poder proceder de forma eficaz con un tratamiento terapéutico adecuado. La dosimetría biológica fue utilizada por primera vez por Bender y Coach en 1962, cuando estimaron la dosis recibida por tres personas expuestas de forma accidental en Handford, Estados Unidos (Prieto *et al.*, 2007). Los biodosímetros son una gran herramienta para casos en los que no hubo presencia de un dosímetro físico o cuando el mismo no provee suficiente información, cuando la dosimetría física expresa sobreexposiciones inexplicables, cuando se sospecha que el portador del dosímetro no utilizó el dosímetro físico, cuando la irradiación no es uniforme, o cuando se sospecha de una sobreexposición en pacientes o trabajadores de servicios hospitalarios que utilizan radiación ionizante (Giovanetti, Sgura y Aversa, 2012; Prieto *et al.*, 2007).

Aunque la radiación ionizante produce lesiones en tejido biológico, no todos los efectos son cuantificables o proporcionales a la dosis. Entre los biodosímetros biológicos utilizados se encuentran:

- a) El síndrome de radiación clínica aguda que se caracteriza por los daños en piel, y sistema hematopoyético, gastrointestinal y cerebrovascular donde la severidad de la lesión depende de la dosis absorbida.
- b) El conteo de linfocitos, el cual disminuye en forma directamente proporcional a la dosis absorbida.
- c) Los marcadores citogenéticos, que son de los métodos más sensibles, entre los que se encuentran el análisis de cromosomas dicéntricos, micronúcleos y análisis de translocaciones por FISH (Giovanetti, Sgura y Aversa, 2012).

Los efectos biológicos para ser utilizados como dosímetros biológicos deben ser cuantificables y proporcionales a la dosis de exposición, además los aspectos logísticos deben presentar simplicidad (por ejemplo: la muestra biológica debe ser fácilmente extraíble), deben medir parámetros que se manifiestan precozmente, ser de rápido análisis, y fácilmente reproducibles (Prieto *et al.*, 2007; Leonard *et al.*, 2005).

Se debe tomar en cuenta el tiempo de exposición al que es sometido el individuo y el área que fue irradiada, para tomar en cuenta el parámetro a utilizar para realizar el estudio (Leonard *et al.*, 2005).

i. Cromosomas dicéntricos:

La estimación de la dosis basándose en el análisis de cromosomas dicéntricos se utiliza desde la década de 1960, es utilizada tanto para dosis agudas como para dosis prolongadas, recibidas en un largo periodo de tiempo (Montoro *et al.*, 2005).

El estudio de cromosomas dicéntricos es considerado el método más sensible para cuantificar una exposición a radiación ionizante, ya que presenta dos grandes ventajas, su frecuencia basal es relativamente baja (1/1000 células) y su límite de detección es a partir de 0,1 Gy, además son fácilmente reconocibles al microscopio; se consideran casi específicos de radiación y son pocos los agentes químicos que pueden provocar su desarrollo, además su número aumenta directamente con la dosis (OIEA, 2014; López, Sáenz, y Ruíz, 2008; Montoro *et al.*, 2005). Su inconveniente radica en que por ser una mutación inestable desaparece en la división mitótica. Pero esto se puede resolver utilizando técnicas para distinguir células en metafase 1 de las células en metafase 2, para lo cual se cultivan las células con un análogo de la timidina (bromodesoxiuridina (BrdU)) seguido de una tinción diferencial de Giemsa en fluorescencia, que se detallará más adelante en la sección de metodología.

ii. Aplicación de Bromodesoxiuridina (BrdU)

Es un análogo de la timidina que permite la diferenciación por microscopía óptica convencional de la primera división mitótica (M1) de la segunda (M2), por medio de la aplicación de BrdU en el cultivo de los linfocitos y fluorógeno, agente intercalante, que establece enlaces con bases nitrogenadas y ayuda a la distinción entre cromátidas monosustituidas (se visualizan arlequines: una cromátida incorpora la BrdU y la otra no, de manera que una cromátida es más oscura que la otra) de las bisustituidas (las dos cromátidas incorporan la BrdU, no se observan arlequines: ambas cromátidas se observan del mismo color) (figura 4) (OIEA, 2014).

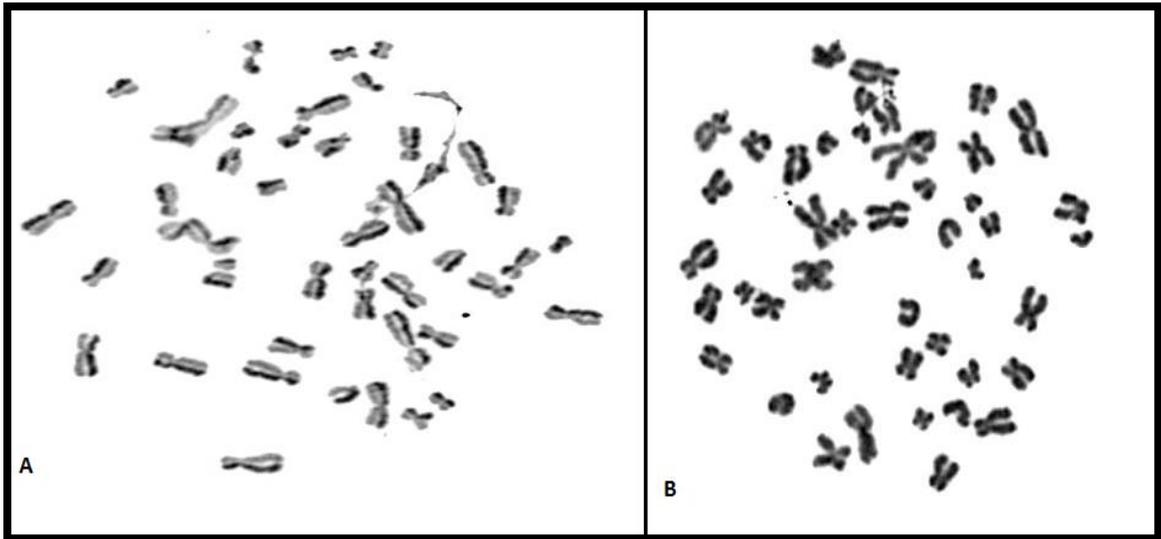


Figura 4: Diferenciación por microscopía óptica convencional de la segunda división mitótica (M2) de la primera (M1). A) Metafase en segunda división mitótica, donde se observan las cromátidas monosustituidas o cromosomas arlequines por la técnica FPG. B) Metafase en primera división mitótica, donde se observan cromátidas bisustituidas. Aumento 100X, Claudia Fernández, INISA 2017.

III. ANTECEDENTES

Antoine *et al.* 1981 hacen un estudio de seguimiento a 6 pacientes con cáncer de mama, a las que se les realiza radioterapia con telecobalto. Se les tomó muestras de sangre a los 0 Gy, 6 Gy, 12 Gy y 22 Gy y se analizaron 200 metafases. Encontraron que conforme aumenta la dosis irradiada aumenta el número de dicéntricos y anillos en el total de las metafases. Matsubara *et al.* (1985) realizan un estudio para comparar los efectos cromosómicos de la braquiterapia y la teleterapia, en el que concluyen que no existe diferencia significativa entre los efectos cromosómicos, medido mediante frecuencia de dicéntricos.

En 1989 Martin *et al.* realizan un estudio en 13 pacientes con cáncer analizando metafases de esperma y sangre periférica antes y después de la radioterapia. Se encontró que después de la radioterapia hay un aumento significativo de dicéntricos, pero que este va disminuyendo conforme pasa el tiempo, aunque 60 meses después se puede seguir observando dicéntricos,

pero en valores muy bajos. En 1990 un estudio realizado con 21 pacientes de cáncer de mama estudiando el efecto de la quimioterapia y la radioterapia encontró que el recibir quimioterapia antes de la radioterapia disminuye significativamente el número de dicéntricos encontrados, sin embargo, si se recibe después de la radioterapia no hay diferencia significativa en el número de dicéntricos (Rigaud *et al.*, 1990).

En 1992, Ramesh y Bhargava realizan un estudio en 4 pacientes antes de realizarles cualquier tratamiento del cáncer, y encuentran que el porcentaje de anomalías cromosómicas (dic, ace, r, chtb, chtg, dmin) es muy bajo, siendo lo máximo 7 dicéntricos en un paciente en 222 metafases. En 1995, Jones *et al.* en un estudio sobre los efectos después de la radioterapia según la dosis, encuentran que existe una relación directamente proporcional entre la dosis recibida por el paciente y la cantidad de dicéntricos y efectos secundarios. Venkatalacham *et al.* (1999a), en un estudio sobre los efectos *in vivo* en 29 pacientes de cáncer con dosis fraccionadas e *in vitro* en pacientes sanos, ambos irradiados con radiación gamma, encontró que las dosis calculadas son similares hasta los 2 Gy, y que el número de dicéntricos aumenta conforme aumenta la dosis suministrada. También en este mismo año el mismo grupo de autores, realizaron un estudio sobre efectos cromosómicos antes del tratamiento de radioterapia y quimioterapia en pacientes con cáncer, comparándolo con un grupo control de pacientes sanos, encontraron que el valor observado de dicéntricos es mayor en los pacientes, aún cuando no existen registros de haber sido expuestos a radioterapia o quimioterapia antes. Sin embargo, Gil *et al.* (2000) demuestran en 22 pacientes de cáncer de tiroides que no existe un incremento de anomalías como dicéntricos o micronúcleos antes del tratamiento con respecto a un grupo control de pacientes sanos.

En el año 2000, un grupo de investigadores realiza un estudio en 18 pacientes con cáncer que recibieron tratamiento de radioterapia recibiendo entre 35-80 Gy en un total de 20 a 35 sesiones, y se analizaron muestras de sangre en diferentes intervalos de tiempo, encontrándose que el número de aberraciones cromosómicas (ace, dic y r) disminuye con el tiempo, y a los 42 meses ya solo el 5% de las metafases analizadas presentan estas anomalías, respecto a anomalías cromatídicas, no se encontraron diferencias significativas entre los intervalos estudiados (Tawn, Whitehouse y Martin, 2000).

Gershkeivitsh *et al.* (2002) realizan un estudio en pacientes con cáncer de próstata y endometrio y encuentra que el número de dicéntricos aumenta conforme el volumen o área

irradiada aumenta, y aunque el área de medula ósea irradiada juega un papel importante, explican que muchos de las metafases que se observan en el análisis son linfocitos T maduros que se encuentran en tránsito en sangre periférica. Legal *et al.* (2002) llega a una conclusión similar después de realizar un estudio en pacientes de cáncer de mama, donde observan que el número de anomalías cromosómicas estables después de la irradiación está fuertemente relacionado con la irradiación de la cadena mamaria interna y el área del ganglio linfático supraclavicular, lo que sugiere que el volumen de vasos sanguíneos irradiados es un parámetro esencial para determinar la tasa de anomalías cromosómicas.

En este mismo año Cao *et al.* realizan un estudio en China, en donde observan que el número de aberraciones cromosómicas aumenta conforme va aumentando el número de sesiones de radioterapia que recibe el paciente.

Hille *et al.* en el 2010 realizan un estudio comparando los valores de dicéntricos antes, en medio y después de la radioterapia, encontrando que los valores aumentan conforme pasa el tiempo, y que un año después se puede seguir observando dicéntricos en proporción muy similar a la encontrada al finalizar el tratamiento con radioterapia. Roch-Lefevre *et al.* (2014) estudian pacientes con el mismo tipo de tumor y localización, realizando análisis de muestras de sangre periférica antes, durante y al finalizar el tratamiento y encuentra que el valor de dicéntricos aumenta con el tiempo, pero sus resultados demuestran que aunque sea el mismo tipo de tumor y las mismas dosis irradiada, los valores de dicéntricos entre un paciente y otro varían.

En Costa Rica no hay estudios al respecto, ya sea analizando sus efectos *in vivo* o *in vitro*, por lo que es muy importante realizar estos estudios biodosimétricos para poder probar las diversas técnicas citogenéticas utilizadas, crear ensayos para dosimetría citogenética, y caracterizar la situación de personas expuestas a radiación, como son los pacientes de radioterapia, personal médico o de la industria. Además de contar con una herramienta de respuesta ante un accidente.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Describir los tipos de cromosomopatías inducidas por la radioterapia en pacientes con cáncer tratados en el Hospital San Juan de Dios, para así conocer las diferentes aberraciones que pueden llegar a ser usadas como marcadores de exposición a radiación gamma.

Objetivos específicos:

1. Describir las distintas aberraciones citogenéticas encontradas en pacientes sometidos a radioterapia, antes y después del tratamiento que pueden ser observados por medio de la técnica llamada Giemsa en fluorescencia.
2. Describir el efecto de la irradiación en pacientes que presenten el mismo tipo de cáncer, para determinar si se presentan el mismo tipo de anomalías cromosómicas.
3. Verificar la dosis recibida por los pacientes utilizando el análisis de cromosomas dicéntricos, por medio de la curva dosis-respuesta del Organismo Internacional de Energía Atómica y del Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones de Cuba; con el fin de saber si usando muestras de sangre periférica se puede llegar a obtener la dosis absorbida real que recibió cada paciente en el tratamiento.

V. METODOLOGÍA

A. Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo observacional transversal, que se caracteriza porque todas las mediciones se hacen en una sola ocasión, por lo que no existen períodos de seguimiento, se efectúa el estudio en un momento determinado del evento de interés (Manterola y Otzen 2014).

B. Población de estudio

Corresponde a pacientes con cáncer que son remitidos a la unidad de radioterapia del Hospital San Juan de Dios.

Este trabajo de tesis forma parte del proyecto 742-B0-304: “Verificación Biológica de la dosis recibida en pacientes tratados con radioterapia del Hospital San Juan de Dios”. Dicho proyecto fue aprobado por el Comité Local de Bioética del Hospital San Juan de Dios (HSJD) con el número CLOBI-HSJD-005-2010 y del Comité de Ético Científico de la Universidad de Costa Rica (oficio: VI-7869-2010).

Todos los participantes en el estudio firmaron un formulario de consentimiento informado.

No se realizó ningún cambio en el tratamiento de los pacientes. Además, el radioterapeuta llevó un cuidadoso registro de todos los detalles del tratamiento de cada uno de los pacientes.

i. Criterios de inclusión y de exclusión

Se incluyeron en el estudio pacientes del Servicio de Radioterapia del Hospital San Juan de Dios; de ambos sexos, mayores de edad (sin límite superior de edad) con diferentes tipos de tumores.

ii. Criterio de exclusión

Se excluyeron las personas que al momento de la toma de la muestra de sangre por criterio del médico tratante estaban en un estado de salud tal que no permitía la toma de la muestra.

C. Muestra en estudio

La muestra consistió en nueve pacientes del servicio de radioterapia del hospital San Juan de Dios entre los años 2014 al 2016, la escogencia de los pacientes se realizó según el esquema de radioterapia: hipofraccionamiento o convencional.

Para cada participante en el estudio, se describieron las características de tipo de cáncer, tipo de aberración cromosómica (dicéntrico, acéntrico, anillos, fractura cromosómica, asociación satelítica) (adjuntar formulario en anexos); además se completó un cuestionario donde se anotaron datos sobre sexo, edad, si ha padecido enfermedades virales, si ha sido sometido con

anticipación a tratamientos de radioterapia o quimioterapia, si vive o está expuesto a medios contaminados (agroquímicos), si fuma o toma medicamentos; esto para tener en cuenta otros agentes químicos, físicos o biológicos que pueden producir anomalías cromosómicas.

D. Esquema de radioterapia

Existe diversos esquemas de radioterapia: uno es el convencional que consiste en sesiones de 1,8-2 Gy/día, 5 días a la semana por 5 a 8 semanas aproximadamente, otro tipo es el hipofraccionamiento que consiste en dosis fraccionadas más grandes que las utilizadas en la radioterapia convencional, dosis grandes de 5 a 15 días (Gregoire *et al.*, 2015). El esquema de radiación de cada participante se presenta a continuación en el cuadro 1:

CUADRO 1

Esquema de tratamiento, dosis de cada fracción, dosis total administrada, duración de tratamiento, tipo de radioterapia de los nueve participantes del servicio de radioterapia del Hospital San Juan de Dios

Participante	Tipo de radioterapia	Sesiones por tratamiento	Dosis fracción (Gy)	Dosis total (Gy)
1	convencional	23	2	46
2	convencional	25	2	50
3	convencional	25	1,8	45
4	convencional	23	2	46
5	hipofraccionamiento	10	3	30
6	convencional	23	2	46
7	hipofraccionamiento	15	2	30
8	hipofraccionamiento	10	3	30
9	hipofraccionamiento	10	3	30

E. Clasificación del tipo de cáncer

Para los pacientes con cáncer de mama se anotaron los datos del estadio (IPN, el cual es un índice derivado de un estudio multivariado retrospectivo, capaz de predecir la supervivencia en pacientes con cáncer de mama; el cual basado en el tamaño del tumor (T=1 si es igual o inferior a 2 cm, T=2 si está entre 2 y 5 cm, T=3 si es mayor de 5 cm, T=4 si hay expansión hacia la piel o la pared torácica), estadio de ganglios linfáticos según la infiltración ganglionar y presencia o no de metástasis, permite la estratificación de pacientes en tres grupos pronóstico distintos: I, II y III. Además de una clasificación: A y B, que indica el tamaño del tumor (T), la afectación de ganglios linfáticos (N) que se enumera N=0 (ausencia de infiltración ganglionar), N=1 (si están afectados de 1 a 3 ganglios); N=2 (si están afectados de 4 a 9 ganglios) y N=3 (si el número es igual o superior a 10 o bien si los ganglios afectados son en la mamaria interna o supraclaviculares). Y por metástasis (M), donde 0 indica ausencia y 1 presencia (Casciato y Territo, 2009; D'eredita *et al.*, 2001).

D. Recolección de datos

i. Toma de la muestra: se obtuvo 5 ml de sangre periférica de cada paciente, esta se recolectó en tubos Vacutainer con heparina sódica liofilizada, mediante flebotomía convencional. Se tomaron dos muestras: una antes de iniciar la sesión de radioterapia, y otra el mismo día en que terminó el esquema de tratamiento. Las muestras se almacenaron en una hielera a 8°C hasta su traslado al laboratorio de genética citomolecular del INISA, en el cual fueron procesadas y cultivadas el mismo día.

ii. Procesamiento de las muestras: se utilizó el protocolo para cromosomas dicéntricos del “*Cytogenetic Dosimetry Application in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies*” (IAEA, 2011).

1. Cultivo de linfocitos: Se añadió a los cultivos celulares el análogo de la timidina: BrdU. Durante la fase de síntesis el ADN incorpora la BrdU presente en el medio en lugar de la timidina, de forma que tras la síntesis, la doble hélice de ADN estará formada por una cadena doble con timidina normal y otra con BrdU (Prieto *et al.*, 2007). Se cultivaron en tubos

cónicos de 15ml, 0,6 ml de cada una de las muestras de sangre en 4,0 ml de medio de cultivo PB-MAX Karyotyping Medium (Invitrogen-GIBCO), en presencia de BrdU a una concentración de 15 μ M. Se incubaron a 37 °C +/- 0.5 °C durante 45 horas. Al completar el tiempo de incubación se agregó 0,1 ml de Colcemid (GIBCO) al cultivo y se volvió a incubar por 3 horas más.

2. Cosecha de linfocitos: pasadas las últimas 3 horas de incubación, se centrifugaron los tubos. Luego, se removió el sobrenadante y se le agregaron de 5 ml a 10 ml de cloruro de potasio (KCl) a 0,075 mol/L y se incubaron a 37°C entre 15–20 min. Después se centrifugaron, se removió el sobrenadante y se agregó 5–10 ml de fijador, que consiste en una mezcla de ácido acético y metanol a una proporción 1:3 respectivamente. Se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se volvió a agregar fijador. Este último procedimiento se repitió 2 veces más. Los tubos se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos en todos los pasos del procedimiento en donde se ameritó.

3. Goteo de las muestras: se utilizaron láminas portaobjetos (Fisherbrand superfrost precleaned, Fisher Scientific) con un borde de vidrio esmerilado. Se gotearon tantas laminas como fue necesario con 2 a 4 gotas (25 microlitros cada gota) de la suspensión de la muestra por paciente, de manera que permitiera el análisis de las mismas.

4. Tinción de las láminas: se utilizó el método fluorescencia más Giemsa (FPG) utilizando BrdU y naranja de acridina. El procedimiento consiste en sumergir en solución de Naranja de Acridina (10^{-6} M) por 10 minutos, seguidamente se realiza un enjuague con agua destilada dos veces y se deja secar. Luego de ello se cubren las láminas en una solución de Na₂HPO₄ 0.07 M pH 9.2 de forma horizontal y se irradian con una lámpara de luz ultravioleta por 30. Se enjuagan las láminas con agua destilada y se sumergen en solución de Ba(OH)₂ saturada por 5 minutos y se enjuagan en agua destilada. Inmediatamente después se sumergen por 3 segundos en HCl 0.1 N y se enjuagan rápidamente con agua destilada, se dejan secar y se tiñen en solución de Giemsa (KaryoMax-GIBCO) por 6 minutos, finalmente se enjuagan con agua destilada y se dejan secar.

iii. Análisis de las preparaciones cromosómicas: las muestras se examinaron en un microscopio óptico con un objetivo de 10X, examinando toda el área del campo de visión conforme se avanza por la lámina. Con el objetivo de 100X se analizaron las metafases que tenían 45 o más centrómeros. Las metafases en las que se podían observar todos los centrómeros de todos los cromosomas y los brazos del mismo se analizaron. Se contó el número de cromosomas, la cantidad de dicéntricos, fragmentos acéntricos, anillos céntricos y excesos acéntricos y cualquier otra cromosomopatía visible en cada metafase. Se analizaron como mínimo 200 metafases para antes y 200 metafases para después de terminado el esquema de tratamiento con radioterapia, todas las metafases analizadas se encontraban en M1. Para el análisis se utilizó los microscopios Olympus CX-31 y Olympus CX-51.

1. Criterios para el análisis citogenético:

- Se tomó en cuenta cromosomas dicéntricos, fragmentos acéntricos y anillos céntricos.
- Los cromosomas dicéntricos y anillos céntricos se tomaron en cuenta cuando esté presente su respectivo fragmento acéntrico.
- Cada anillo céntrico y un cromosoma dicéntrico debe tener un fragmento acéntrico en la metafase.
- Las metafases con cromosomas dicéntricos y su respectivo fragmento acéntrico debe contar 46 cromosomas, en cambio las metafases con anillo céntrico con su correspondiente fragmento acéntrico deben contar 47 cromosomas.
- Las aberraciones tricéntricas equivalen a 2 dicéntricos y deberán aparecer 2 fragmentos acéntricos, las cuadricéntricas mostrarán 3 dicéntricos y 3 fragmentos acéntricos; y así sucesivamente.
- Los fragmentos acéntricos no asociados a dicéntricos o anillos acéntricos se contarán como excesos acéntricos.
- Las translocaciones e inversiones fueron contabilizadas cuando la morfología sea suficientemente clara para identificarlas.
- Se tomó en cuenta metafases con 45 cromosomas o más.

- Se contabilizó toda otra cromosomopatía encontrada y que sea distinguible al microscopio.
- Dobles minutas, anillos acéntricos y excesos acéntricos serán tomados como excesos acéntricos.

2. Frecuencia de aberraciones: para cada paciente se obtuvo la frecuencia de cada cromosomopatía encontrada y se compararon las frecuencias antes y después de cumplido el esquema de tratamiento. En los casos en que los pacientes presenten el mismo tipo de cáncer y hayan sido irradiados en la misma zona se compararon las frecuencias de las cromosomopatías entre ellos.

F. Análisis estadístico:

i. Cálculo de la dosis absorbida

Se utilizó el programa Chromosomal Aberration Calculation Software versión 2.0 (CABAS), programa diseñado como parte de la tesis de maestría en matemáticas por Joanna Deperas en Polonia, diseñado para calcular la dosis estimada absorbida según una relación cuadrática de dosis-respuesta utilizando valores de anomalías cromosómicas observadas (dic). Los datos de la curva se tomaron de la curva para rayos Gamma del IAEA presente en el manual de “Dosimetría citogenética: Aplicaciones en materia de preparación y respuesta a las emergencias radiológica” del OIEA (2014) (cuadro 2) y la curva del CPHR (figura 5).

La curva dosis respuesta utilizada es:

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2$$

Donde:

Y = valor de dicéntricos,

D = dosis,

C = frecuencia base de dicéntricos,

α = coeficiente lineal

β = coeficiente del cuadrado de la dosis.

CUADRO 2

Dosis estimada absorbida según una relación cuadrática de dosis-respuesta. A: Número y distribución de dicéntricos (X) y número de metafases analizadas. B) coeficientes C, α y β obtenidos de los datos de A. OIEA (2014).

Rayos γ (cobalto 60)												
A	Dosis (Gy)	N	X	Distribución celular de dicéntricos						σ^2/y	u	
				0	1	2	3	4	5			6
	0,000	5 000	8	4 992	8						1,00	-0,07
	0,100	5 002	14	4 988	14						1,00	-0,13
	0,250	2 008	22	1 987	20	1					1,08	2,61
	0,500	2 002	55	1 947	55						0,97	-0,86
	0,750	1 832	100	1 736	92	4					1,03	0,79
	1,000	1 168	109	1 064	99	5					1,00	-0,02
	1,500	562	100	474	76	12					1,06	1,08
	2,000	332	103	251	63	17	2				1,14	1,82
	3,000	193	108	104	72	15	2				0,83	-1,64
	4,000	103	103	35	41	21	4	2			0,88	-0,84
	5,000	59	107	11	19	11	9	6	3		1,15	0,81
	Promedio										1,0	

Rayos γ (cobalto 60)			
B	C \pm SE	α (Gy ⁻¹) \pm SE	β (Gy ⁻²) \pm SE
	0,00128 \pm 0,00047	0,02103 \pm 0,00516	0,06307 \pm 0,00401
		F = 4,08, p < 0,03	F = 15,73, p < 0,01

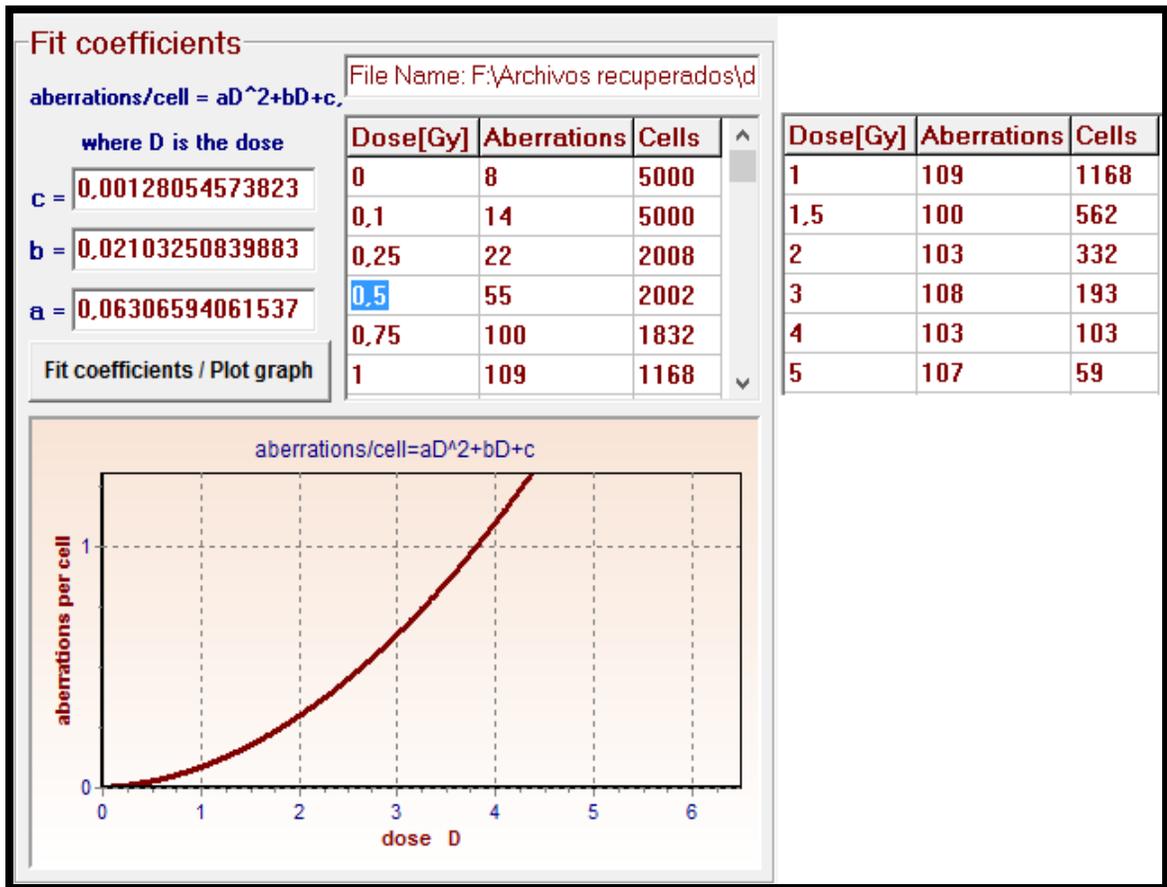


Figura 5: Curva dosis-respuesta proporcionada por el CPHR, con los valores de los coeficientes C, α y β , y proporción de dicéntricos (aberraciones) y número de células analizadas en cada dosis para generar la curva, programa CABAS.

Además, se calculó la dosis por el método de Dolphin, que analiza la distribución sobredispersa de dicéntricos entre todas las células analizadas, considerando que hay dos grupos celulares: un grupo que sigue una distribución de Poisson que representa la fracción irradiada del cuerpo y un grupo de células no expuesta a la radiación. El daño de células se describe con la ecuación:

$$\frac{Y_f}{1 - e^{-Y_f}} = \frac{X}{2N - n_0}$$

Donde:

Y_f = producción media de dicéntricos en la fracción irradiada,

e^Y = número de células no lesionadas de la fracción irradiada,

X = número de dicéntricos observados,

N = total de células

n_0 = número de células que no presentan dicéntricos.

Además, se puede calcular la fracción de cuerpo irradiado en los pacientes (F), con la fórmula:

$$F = \frac{f/p}{21 - f + \left(\frac{f}{p}\right)}$$

Donde p es la fracción de células irradiadas (Y_f) y f = fracción de células irradiadas que han sido examinadas. El valor de p se obtiene de la fórmula:

$$p = \exp(D/D_0)$$

Donde D es la dosis estimada y D_0 es 2,7. Para utilizar el método de Dolphin los datos no deben seguir una distribución de Poisson, lo cual se determina mediante el estadístico de la prueba de la u . Todos estos cálculos fueron realizados con el programa CABAS.

En este análisis estadístico la población estudiada está conformada por los linfocitos, y la muestra por paciente analizado es de al menos 200 células. Uno de los requisitos para utilizar la curva del CPHR y el OIEA para el cálculo de la dosis absorbida es utilizar solamente las metafases contabilizadas con 46 centrómeros. En este estudio se hizo el cálculo de dosis absorbida utilizando 46 centrómeros; sin embargo, para el análisis de estimación de la dosis se hicieron dos análisis, uno utilizando únicamente las metafases con 46 centrómeros cromosomas y un segundo análisis utilizando todas las metafases analizadas (entre 45 a 47 centrómeros).

Prueba de la u : en ella se calcula la distribución Poisson. Valores entre -1,96 a 1,96 siguen una distribución de Poisson. Valores mayores a 1,96 indican sobredispersión. Y valores menores a -1,96 indica subdispersión que pueden indicar que ha habido un problema en la obtención de la muestra (OIEA 2014). Se basa en la fórmula:

$$u = \left(\frac{\sigma^2}{y} - 1\right) \sqrt{\frac{N-1}{2\left(1 - \frac{1}{X}\right)}}$$

Donde:

σ^2 : es la varianza

y= a la media

N es el número de células analizadas

X el número de dicéntricos

El cálculo lo realiza el programa CABAS, el cual indica si los datos del participante siguen o no la distribución poisson y el valor de u (figura 6).

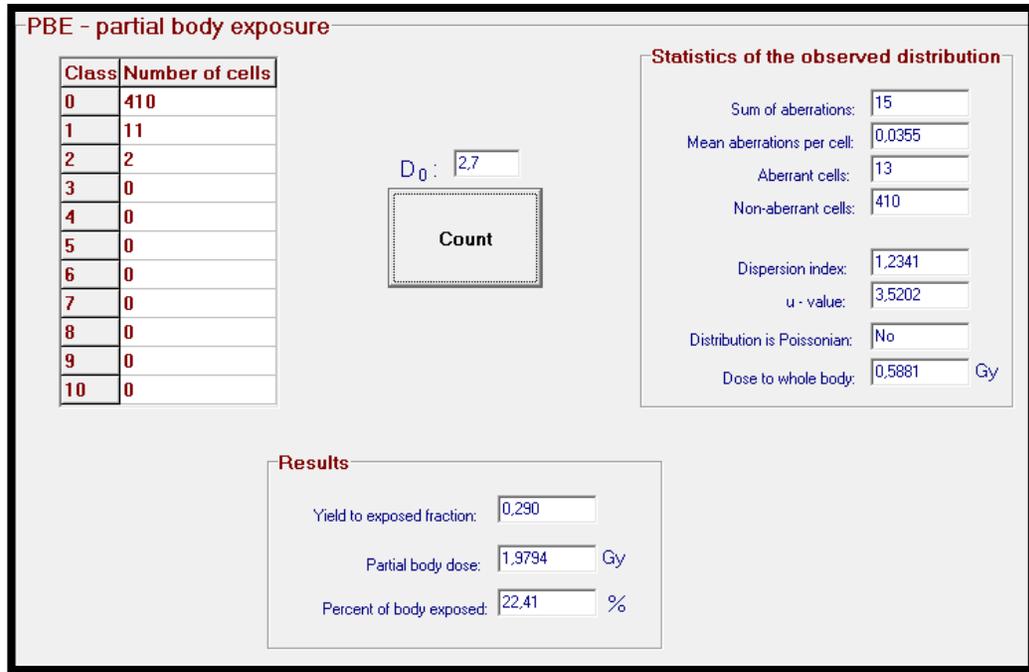


Figura 6: Pantalla del programa CABAS para el cálculo de dosis absorbida en exposición parcial, con su respectivo cálculo de distribución de poisson

ii. Cálculo de dosis equivalente de cuerpo entero (DECE)

Se determinó la dosis equivalente a cuerpo entero de la radiación parcial aplicada a cada participante, utilizando la fórmula suministrada por Roche-Lefevre (2014), donde calculan la dosis integral de la siguiente manera:

$$dosis\ integral = \frac{1,44 \times D_0 \times d \frac{1}{2} \times Ax \left[1 - \exp\left(\frac{0,6938d}{d \frac{1}{2}}\right) \right] x \left(1 + \frac{2,88d \frac{1}{2}}{f}\right)}{1000}$$

Donde D_0 es la dosis administrada (Gy), A = área irradiada (cm^2), $d_{1/2}$ = distancia media de la fuente, d = altura del paciente, para ello se utilizó el valor del estudio de NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC (2016) para Costa Rica: 156,4 para mujer y 168,9 para hombre), y f = distancia de la fuente a la superficie de la piel (cm). El valor obtenido de dosis integral se dividió entre el peso del paciente (valor calculado a partir de NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC), basándose en un IMC de 22,8, obtenido como promedio de estudios sobre el peso en pacientes de oncología (Roque 2007; Sotelo et. al. 2013; Valenzuela-Landaeta y Basfi-fer 2012)

iii. Análisis de comparación entre antes y después del tratamiento, y análisis de correlación

Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 19 de IBM. Para el análisis de cromosomopatías encontradas antes y después de la radioterapia se utilizó el análisis no paramétrico de U- Mann Whitney, que compara dos poblaciones independientes. Para el análisis de correlación entre la dosis calculada, área irradiada y volumen de médula ósea irradiado se utilizó la correlación bivariada de Pearson. El nivel de confianza utilizado fue de 95%.

VI. RESULTADOS

Descripción de la muestra de pacientes con cáncer

Los participantes analizados presentan edades entre los 17 y 88 años ($58,3 \text{ años} \pm 19,32$); correspondientes a 5 mujeres y 4 hombres. Los participantes están diagnosticados con cáncer de mama, cáncer de próstata, melanoma metastásico y linfoma de Hodgkin. Tienen diversas ocupaciones: ama de casa, misceláneo, profesor, agricultor y estudiante. Cinco de los nueve participantes recibieron quimioterapia previa, y al participante 2 se le realizó la quimioterapia durante el mismo lapso que la radioterapia (cuadro 3).

CUADRO 3

Datos sobre sexo, edad, tipo de cáncer, información de medicamentos y enfermedades de cada paciente participante en la investigación.

N	Edad	Sexo	Tipo de cáncer	RP*	QP**	Medicamentos	Otras enfermedades
1	72	F	Mama	No	No	Insulina, Metformina	Diabetes, HTA
2	53	F	Mama	No	Sí	Trastuzumab, Anaztrazole	NI
3	68	F	Mama	No	Sí	Dextrometorfano Taxol, FEC, Docetaxel, Caboplastino, Trastuzumab	NI
4	54	F	Mama	No	Sí	RET, Amicodex	Hernia de disco
5	88	M	Próstata con metástasis ósea	No	No	Bicalutamina, Zoledronato	NI
6	50	M	Cérvix	No	sí	Enalapril, Flutamina Voltaren, Dexametasona	Bocio multinodular
7	60	M	Melanoma metastásico	No	No	Piridium	Radiodermatitis
8	63	F	Carcinoma epidermoide de tejido blando inguinal	No	No	Prednisona, hexametasona Procalcitonina, oxacilina Ciprofloxacina, Metformina	Diabetes
9	17	M	Linfoma de Hodgkin	No	Sí	Cefalexina, Amoxicilina	Adenopatía

N=participante, *RP= radioterapia previa, **QP= quimioterapia, F= femenino, M= masculino, FEC= fluoracilo, Epirrubicina, ciclofosfamida, NI= no indica, HTA=hipertensión arterial.

Cromosopatías encontradas en pacientes sometidos a radioterapia, antes y después del tratamiento con cobalto 60

Se encontraron conteos de 0 a 8 dicéntricos antes de la radioterapia, y valores entre 3 a 22 dicéntricos después de la radioterapia, observándose un aumento de dicéntricos (dic) (figura 7) después del tratamiento en los nueve casos estudiados. Además, se observaron cromosomas en anillo (r) (figura 8), fragmentos acéntricos (ace) (figura 9), fracturas cromatídicas (chtb) (figura 10) y asociaciones satelíticas (AS) (figura 11) (cuadro 4). Cualquier alteración de tamaño, o si en el conteo de cromosomas faltan o hay cromosomas adicionales de algún grupo, se contabilizó como alteración morfológica (AM) (Figura 12). Además, uno de los participantes masculinos presentó un 19% de sus metafases sin un cromosoma del grupo G.

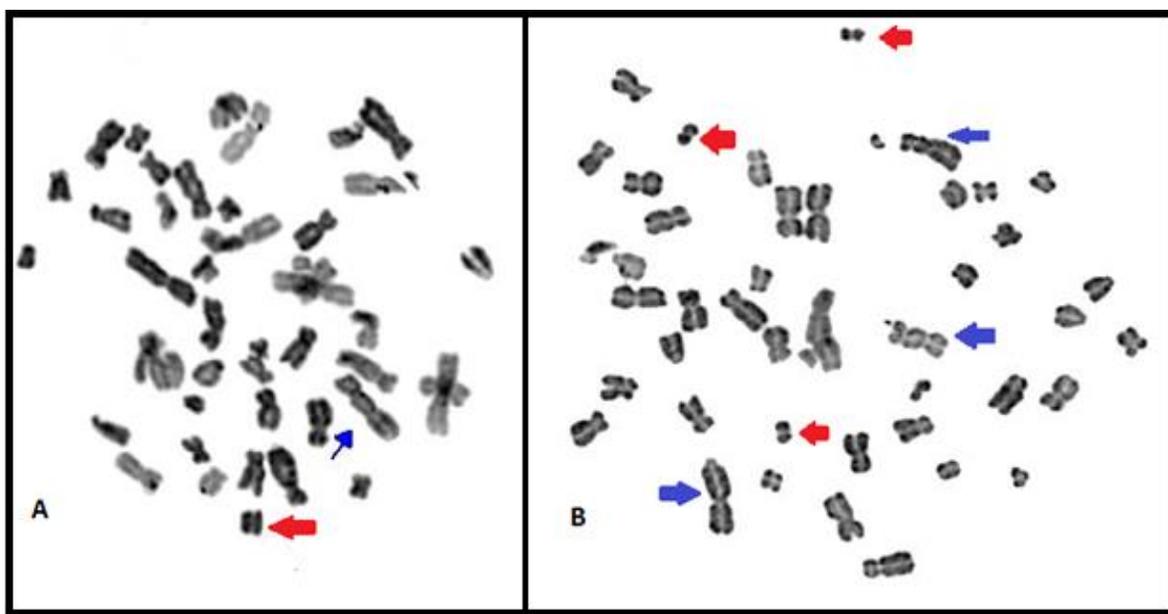


Figura 7: Dicéntricos con su respectivo acéntrico observados en figuras mitóticas analizadas de pacientes sometidos a radioterapia. A= metafase observada antes del tratamiento de radioterapia. B: metafase observada después del tratamiento. Tinción FPG. Flecha roja: ace, flecha azul: dic. Aumento 100X. Claudia Fernández Barrero, INISA, 2017.



Figura 8: Cromosoma en anillo (flecha azul) observados en figuras mitóticas analizadas de pacientes sometidos a radioterapia. Tinción FPG. Aumento 100X. Claudia Fernández Barrero, INISA, 2017.

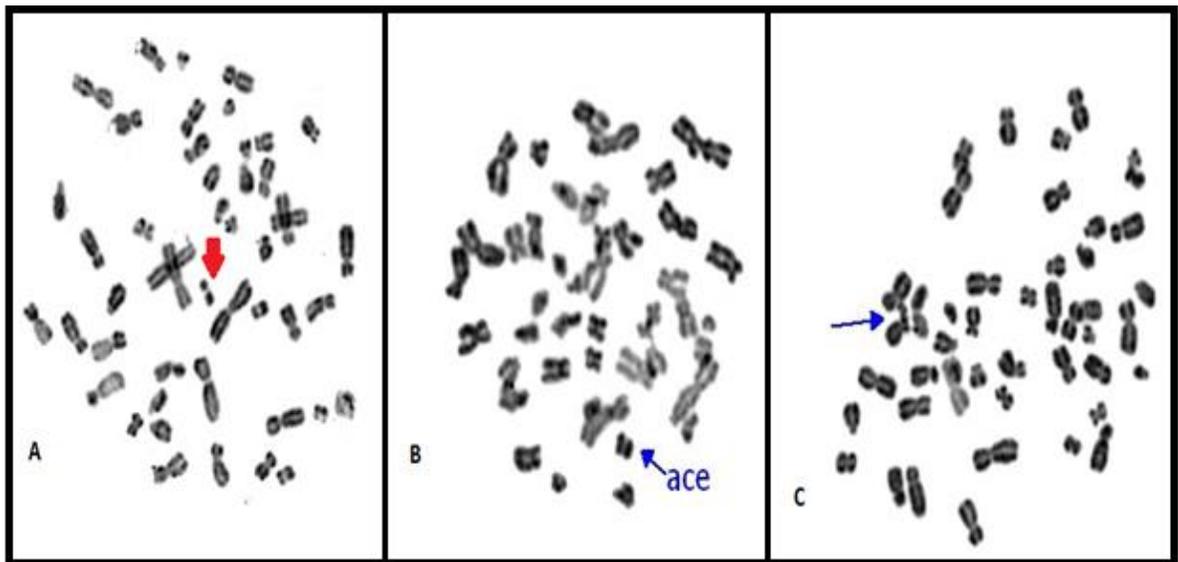


Figura 9: Excesos acéntricos observados en figuras mitóticas analizadas de pacientes sometidos a radioterapia. A= metafase observada antes del tratamiento de radioterapia. B y C: metafases observadas después del tratamiento. Tinción FPG. Aumento 100X. Claudia Fernández Barrero, INISA 2017.

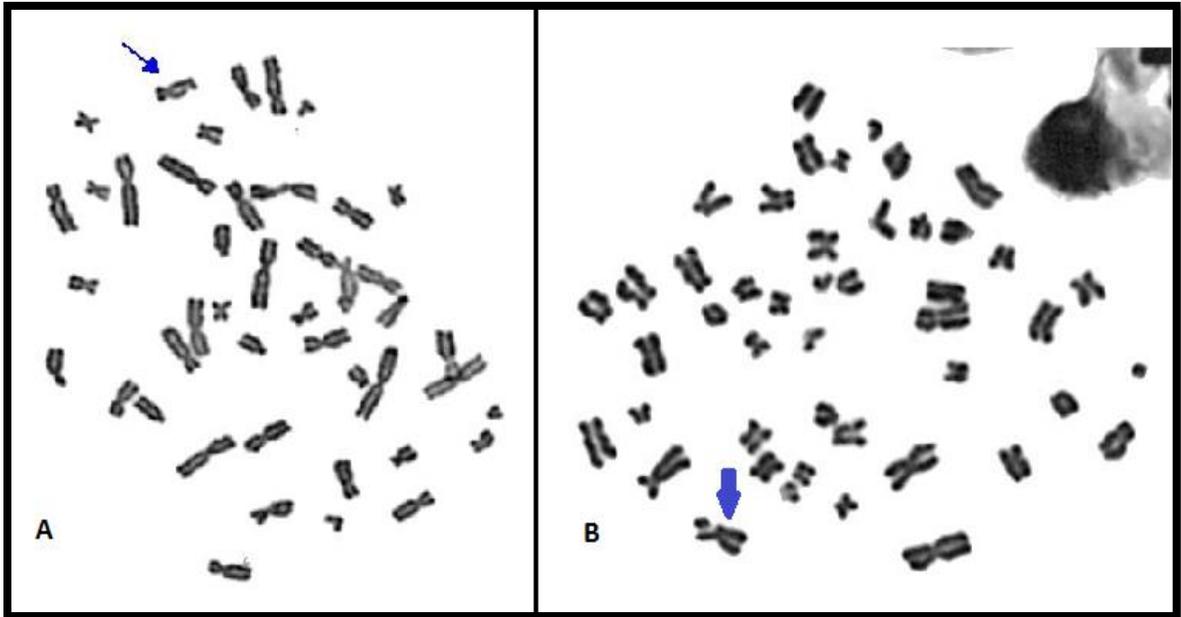


Figura 10: Fracturas cromatídicas (flecha azul) observadas en figuras mitóticas analizadas de pacientes sometidos a radioterapia. A= metafase observada antes del tratamiento de radioterapia. B: metafase observada después del tratamiento. Tinción FPG. Aumento 100X. Claudia Fernández Barrero INISA 2017.

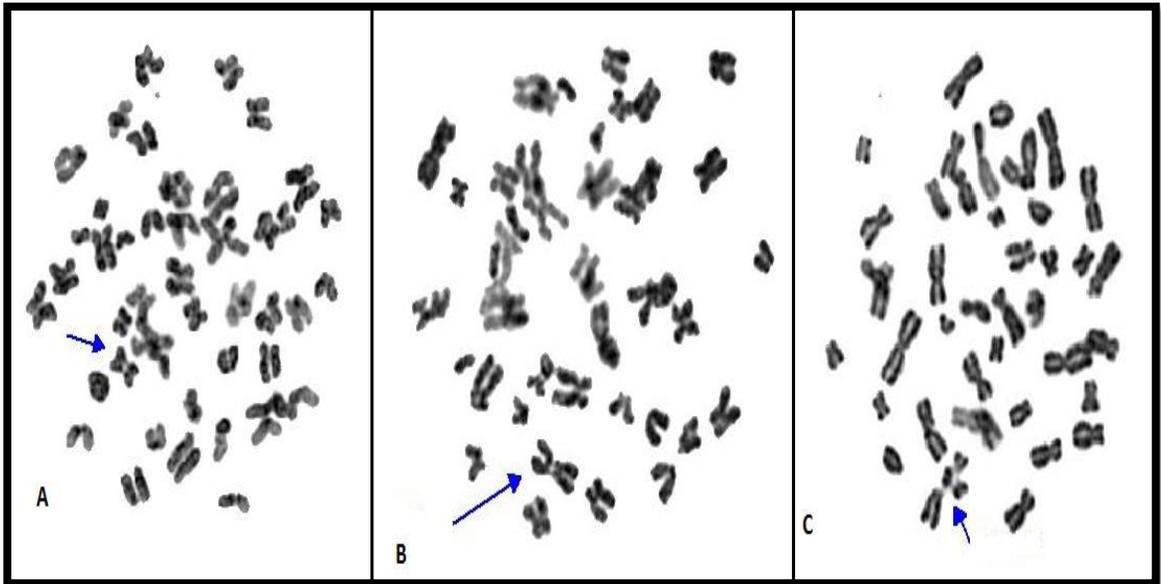


Figura 11: Asociación satelítica (flecha azul) observada en figuras mitóticas analizadas de pacientes sometidos a radioterapia. A= metafase observada antes del tratamiento de radioterapia. B y C: metafases observadas después del tratamiento. Tinción FPG. Aumento 100X. Claudia Fernández Barrero INISA 2017.

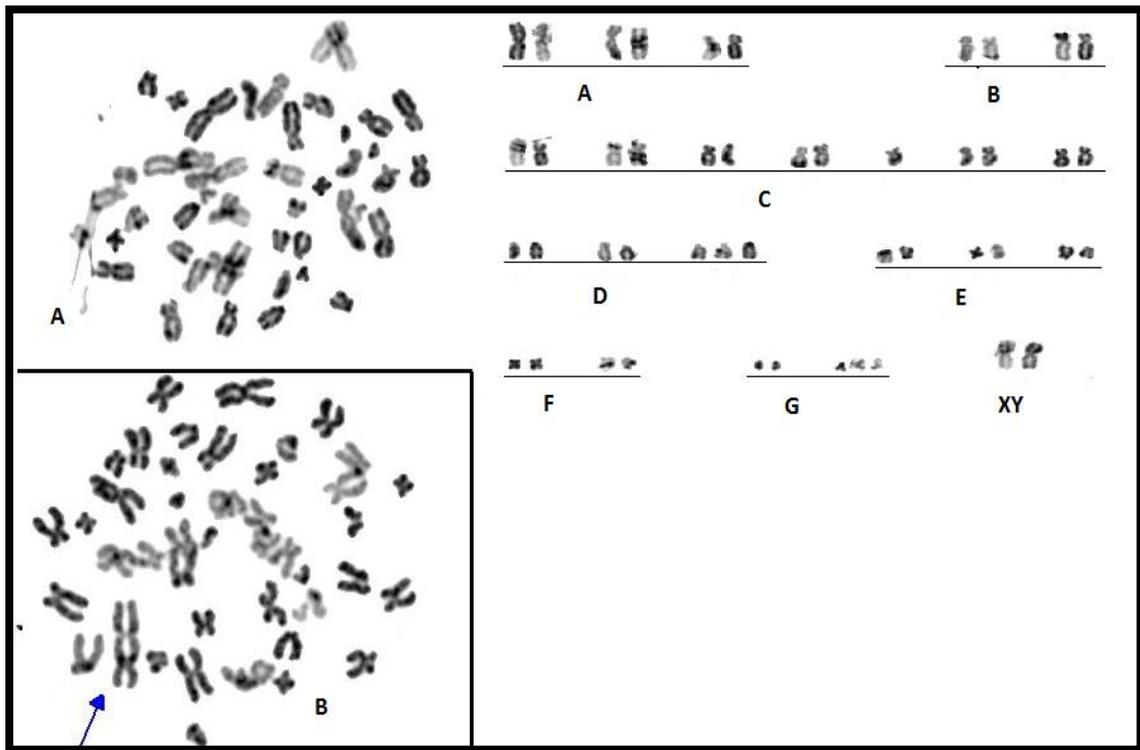


Figura 12: Anomalia morfológica observada en figuras mitóticas analizadas de pacientes sometidos a radioterapia. A) Metafase analizada con su respectivo cariograma, donde se observa un cromosoma G y D de más, así como la ausencia de un cromosoma C, lo cual podría indicar una posible translocación o duplicación. Tinción FPG. B) La flecha azul señala un chr más grande de lo normal lo que podría indicar una translocación o duplicación. Aumento 100X. Claudia Fernández Barrero INISA 2017.

En los resultados de todos los participantes se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el conteo antes y después de dicéntricos, observándose un aumento después de la radioterapia para cada participante. Este mismo comportamiento se observa al analizar en conjunto los dicéntricos y los cromosomas en anillo; y al analizar juntos todos los datos a excepción de AS (cuadros 4 y 5). Se excluye de este análisis al paciente 4, debido a que no se encontraron metafases antes de la radioterapia. En el caso de las asociaciones sateliticas se observó que solo en los casos de los participantes 1 y 6 (cuadro 5) existe una diferencia

significativa entre el conteo antes y después de la radioterapia, observándose, al igual que en las otras comparaciones, un aumento de AS después de la radioterapia.

CUADRO 4
Cantidad de las alteraciones morfológicas encontradas en las metafases (46 chr \pm 1) de los participantes antes y después de la radioterapia con cobalto 60.

N	Toma de muestra*	Metafases analizadas	dic	r	ace	chtb	AM	AS
1	Antes	560	0	0	4	4	2	9
	Después	432	26	1	19	7	4	0
2	Antes	402	0	0	3	3	1	5
	Después	464	8	0	18	3	1	9
3	Antes	426	2	0	4	8	2	8
	Después	276	6	1	11	7	0	6
4	Antes	0	0	0	0	0	0	0
	Después	78	3	0	2	0	0	1
5	Antes	428	0	0	3	4	0	4
	Después	315	13	0	17	5	0	5
6	Antes	445	0	0	2	5	0	7
	Después	316	9	1	11	6	1	0
7	Antes	482	8	0	15	9	0	5
	Después	317	21	0	32	3	0	5
8	Antes	459	0	0	4	2	1	1
	Después	402	10	1	18	4	0	2
9	Antes	472	0	0	6	5	0	1
	Después	423	15	0	20	8	0	4

N=participante, *Toma de muestra respecto a la radioterapia, Dic: dicéntrico, R= anillo, ace= acéntrico, chtb= fractura cromatídica, AM= alteración morfológica, AS= asociación satelítica.

CUADRO 5
Comparación de alteraciones morfológicas encontradas en las metafases de cada participante antes y después de la radioterapia con cobalto 60.

N	Toma de muestra*	dic	dic+r	dic+r+ace+A M+chtb	AS	chtb
1	Antes	0	0	10	9	4
	Después	26	27	57	0	7
p**		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,177
2	Antes	0	0	7	5	3
	Después	8	8	30	9	3
p**		0,008	0,008	0,001	0,418	0,860
3	Antes	2	2	16	8	8
	Después	6	7	25	6	7
p**		0,035	0,016	0,003	0,756	0,530
4	Antes	0	0	0	0	0
	Después	3	3	5	1	-
p**		-	-	-	-	-
5	Antes	0	0	7	4	4
	Después	13	13	35	5	5
p**		<0,05	<0,05	<0,05	0,422	0,426
6	Antes	0	0	7	7	5
	Después	9	10	28	0	6
p**		<0,05	<0,05	<0,05	0,026	0,371
7	Antes	8	8	32	5	9
	Después	21	21	56	5	3
p**		<0,05	<0,05	<0,05	0,396	0,167
8	Antes	0	0	7	1	2
	Después	10	11	33	2	4
p**		<0,05	<0,05	<0,05	0,446	0,280
9	Antes	0	0	11	1	5
	Después	15	15	43	4	8
p**		<0,05	<0,05	<0,05	0,142	0,299

N=participante, *Toma de muestra respecto a la radioterapia, ** U-Mann Whitney, dic=dicéntrico, ace=fragmento acéntrico, r=anillo; AS= asociación satelítica, chtb= fractura cromatídica.

Efecto de la irradiación en pacientes que presenten el mismo tipo de cáncer.

Cuatro participantes, presentaron el mismo tipo de cáncer el cual fue cáncer de mama. Con respecto a los participantes con cáncer de mama, todos presentaron después del tratamiento cromosomas dicéntricos y excesos acéntricos; con respecto a los anillos solo los

participantes 1 y 3 presentaron esta morfología, y solo el participante 1 presentó fracturas cromatídicas y alteraciones morfológicas.

En el cuadro 6 se observa que todos los participantes con cáncer de mama presentan un índice pronóstico de Nottingham (IPN) de grado II y III. Tres de ellos presentan un estadio IPN de II que indica que el tumor tiene un tamaño de entre 2 y 5 centímetros, con o sin afectación de ganglios axilares y al ser de tipo A indica que se clasifica como T=0, 1 ó 2; N=0 ó 1, y M=0. En el caso del paciente 3, este presenta un grado IIIA, que indica que el tumor afecta ya los ganglios axilares, piel y pared torácica, y que T=0, 1 ó 2, N=3 y M=0. Además en tre de los pacientes la médula ósea se vió afectada por la radioterapia (cuadro 7).

CUADRO 6

Frecuencia de alteraciones morfológicas obtenidas en participantes con cáncer de mama después de la radioterapia con cobalto 60.

N	Estadío del tumor	Área irradiada (cm ²)	Dosis irradiada (Gy)	dic	r	ace	chtb	AM	AS
1	A II	209	44	0,060	0,002	0,037	0,009	0,006	0,000
2	A III	234	48	0,017	0,000	0,032	0,000	0,000	0,008
3	A II	165,75	43,2	0,014	0,004	0,025	0,000	0,000	0,000
4	A II	209	44	0,038	0,000	0,026	0,000	0,000	0,013

N=participante, dic=dicéntrico. ace=fragmento acéntrico, r=anillo; AS= asociación satelítica, chtb= fractura cromatídica

CUADRO 7

Diagrama de volumen que indica la fracción de dosis irradiada que afecta los órganos cercanos al tumor irradiado con cobalto 60.

Órgano	% del órgano irradiado			
	Participante 1	Participante 2	Participante 3	Participante 4
Pulmón derecho	22,27%	21,98%	3,56%	4,03%
Pulmón izquierdo	4,32 %	NI	18,10%	3,78%
Corazón	6,39%	NI	5,56%	4,89%
Medula ósea	4,16%	NI	3,3%	3,39%

Estimación citogenética de la dosis absorbida

El número de sesiones de radioterapia es bimodal, de manera que en los participantes 5, 7, 8 y 9 la radioterapia fue de hipofraccionamiento con un número de sesiones entre 10 y 15, mientras que a los demás se les realizó entre 23 y 25 sesiones. Respecto a la dosis absorbida, se obtuvo valores de dosis absorbida de cuerpo entero menores al DECE calculado para cada paciente (cuadro 10).

El cálculo de dosis, ya sea para exposición parcial o total, se realiza en función del número de dic por célula, de manera que los valores de esta varían si el análisis se realiza usando solamente metafases con 46 centrómeros (Cuadro 8) o si se usan metafases con 45 a 47 centrómeros (Cuadro 9).

CUADRO 8

Distribución del número de dicéntricos por célula en los nueve participantes sometidos a radioterapia con cobalto 60, en metafases de 46 centrómeros.

Participante	N	dic	Cantidad de dic por célula			
			0	1	2	3
1	312	18	309	12	3	0
2	374	6	368	6	0	0
3	202	4	198	4	0	0
4	58	3	55	3	0	0
5	239	11	229	9	1	0
6	254	9	245	9	0	0
7	226	16	210	14	1	0
8	277	7	270	7	0	0
9	342	11	331	11	0	0

N= número de metafases.

CUADRO 9

Distribución del número de dicéntricos por célula en los nueve participantes sometidos a radioterapia con cobalto 60 tomando en cuenta metafases con 45 a 47 centrómeros.

Participante	N	dic	Cantidad de dic por célula			
			0	1	2	3
1	432	26	412	15	4	1
2	464	9	455	9	0	0
3	276	5	271	5	0	0
4	78	3	75	3	0	0
5	315	13	304	9	2	0
6	316	9	307	9	0	0
7	317	16	303	14	2	0
8	402	10	393	8	1	0
9	423	15	410	11	2	0

N= número de metafases.

Los valores obtenidos de la curva, usando solamente metafases con 46 centrómeros muestran que los datos siguen una distribución de Poisson; por lo tanto la dosis obtenida se cataloga como una radiación de exposición de tipo total y no parcial (cuadros 12). Mientras que al tomar en cuenta metafases con 45 a 47 centrómeros se puede analizar por el método de

Dolphin y obtener valores de porcentaje de cuerpo entero irradiado y la dosis absorbida parcial para 5 de los participantes, las cuales están muy por debajo de la dosis real administrada en el tratamiento (cuadro 10 y 12).

Es importante aclarar que al momento de realizar los cálculos utilizando la curva del OIEA y de CPHR se observó que los datos de sus curvas eran iguales, por lo que se decidió informar un único resultado que representa ambas curvas.

No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la dosis calculada a cuerpo entero y el área irradiada del paciente, tanto al considerar metafases de 46 centrómeros ($r^2 = 0,558$; $p = 0,118$), como metafases de 45 a 47 centrómeros ($r^2 = 0,094$; $p = 0,906$), o al considerar únicamente los participantes con cáncer de mama ($r^2 = 0,192$; $p = 0,808$).

CUADRO 10

Características de la irradiación en los pacientes de radioterapia utilizando cobalto 60

N	Dosis total (Gy)	Hipofraccionamiento	# Metafasas	Dic	Campo de irradiación (cm ²)	Dosis calculada (Gy)*	Tipo exposición calculada (poisson)**	DECE*** (Gy)	% de médula irradiada (%Gy)
1	44	No	312	18	209	0,78	Parcial	3,42	4,16
2	48	No	374	6	234	0,35	Total	4,19	0
3	43,2	No	202	4	165,75	0,4	Total	2,33	3,3
4	44	No	58	3	209	0,74	Total	3,43	3,39
5	27	Sí	239	11	440	0,69	Total	3,84	NSI
6	44	No	254	9	592	0,59	Total	9,82	NSI
7	28	Sí	226	16	75,6	0,9	Total	0,68	NSI
8	27	Sí	277	7	182	0,47	Total	1,78	NSI
9	27	Sí	342	11	370	0,55	Total	3,14	NSI

N=participante, *dosis absorbida en cuerpo entero calculada utilizando el programa CABAS y la curva del OIEA. ** calculada por el programa CABAS. *** DECE: dosis equivalente de cuerpo entero, NSI= no se indica.

CUADRO 11

Dosis calculada con el programa CABAS, utilizando metafases de 46 centrómeros, en comparación a conteo de metafases con 45 a 47 centrómeros.

N	Conteo de metafases de 46 centrómeros			Conteo de metafases de 45 a 47 centrómeros			DECE (Gy)
	# metafases	# dic	Dosis calculada (Gy)	# metafases	#dic	Dosis calculada (Gy)	
1	312	18	0,77	432	26	0,81	3,42
2	374	6	0,35	464	9	0,39	4,19
3	202	4	0,4	276	5	0,38	2,33
4	58	3	0,74	78	3	0,62	3,43
5	239	11	0,69	315	13	0,65	3,84
6	254	7	0,59	316	8	0,51	9,82
7	226	16	0,9	317	16	0,73	0,68
8	277	7	0,47	402	10	0,47	1,78
9	342	11	0,55	423	15	0,59	3,14

N=participante.

CUADRO 12

Cálculo de la dosis de la fracción de células expuesta y porcentaje del cuerpo expuesto calculado con el programa CABAS para los 9 participantes.

Participante	Conteo de 46 cromosomas				Conteo de 45 a 47 cromosomas			
	Poisson*	Prueba de u^{**}	Dosis a cuerpo entero (Gy)	% cuerpo expuesto	Poisson*	Prueba de u^{**}	Dosis a cuerpo entero(Gy)	% cuerpo expuesto
1	no	3,68	2,29	28,46	no	7,56	2,79	25,54
2	sí	-0,2	--	--	sí	-0,28	--	--
3	sí	-0,17	--	--	sí	-0,19	--	--
4	sí	-0,22	--	--	sí	-0,2	--	--
5	sí	1,61	--	--	no	3,53	2,16	23,41
6	sí	-0,38	--	--	sí	-0,34	--	--
7	sí	0,64	--	--	no	2,2	1,79	37,24
8	sí	-0,28	--	--	no	2,66	1,66	19,85
9	sí	-0,4	--	--	no	3,52	1,98	22,41

*= datos siguen una distribución Poisson calculado con el programa CABAS, **= calculado con el programa CABAS.

VII. DISCUSIÓN

El uso de la dosimetría biológica utilizando marcadores citogenéticos, es de gran importancia para el monitoreo de irradiaciones ocupacionales por trabajadores expuestos a ella en pacientes de los servicios de radioterapia, y en el diagnóstico de sobreirradiaciones. Además, posee la característica de que los marcadores citogenéticos se consideran característicos de radiación y la muestra biológica para su análisis es de fácil obtención. Aunque la radioterapia puede producir diversas cromosomopatías, la más característica son los cromosomas dicéntricos, el cual es el marcador más utilizado por ser fácil de analizar y porque su frecuencia basal en población sana y sin haber sido irradiada ronda en 1 a 2 por cada mil células analizadas. En distintos estudios se ha observado un aumento significativo del número de cromosomas dicéntricos, excesos acéntricos y anillos después del tratamiento con radioterapia (Castro-Volio, 2013; Ainsbury *et al.*, 2010). Existen diversos estudios en pacientes de radioterapia que demuestran un aumento significativo de dicéntricos después de la radioterapia (Roch-Lefevre *et al.*, 2014; Hille *et al.*, 2010; Venkatalacham *et al.*, 1999a; Jones *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1989).

Cromosomopatías encontradas en pacientes sometidos a radioterapia, antes y después del tratamiento con cobalto 60

En la población en estudio dos de los participantes (cuadro 4) presentan cromosomas dicéntricos antes del tratamiento con radioterapia. Se han informado estudios en donde se demuestra un aumento de cromosomas dicéntricos en pacientes con distintos tipos de cáncer antes de los tratamientos de radioterapia, sin embargo, este aumento se atribuye al efecto de medicamentos para la quimioterapia; además de que estos pacientes pueden presentar una inestabilidad cromosómica observable en sangre periférica, producida por su propia patología debido que el cáncer produce una lesión en los telómeros que eventualmente produce una fusión, lo cual podría ayudar a explicar lo observado en los 2 participantes (Venkatachalam *et al.*, 1999b; Maser y DePhino, 2002).

Uno de los participantes de los arriba mencionados, fue sujeto a quimioterapia, finalizando un mes antes de la radioterapia; entre los medicamentos con que fue tratado resaltan el paclitaxel (taxol) y el docetaxel. Para el primero se ha comprobado su capacidad genotóxica

en humanos, ratones y *Drosophila* sp., tanto en células somáticas como en células germinales (Danesi *et al.*, 2010; Tinwell y Ashby, 1994). En el caso del docetaxel, este ha sido informado como genotóxico, produciendo un aumento de micronúcleos y cromosomas dicéntricos (Alidema y Kryeziu-Alidema, 2015). En el caso del otro participante, este es un agricultor, por lo que estaba ocupacionalmente expuesto a plaguicidas. Gentile *et al.* (2016) indican una asociación estadísticamente significativa entre la frecuencia de micronúcleos y aberraciones cromosómicas (incluyendo dicéntricos), en personas expuestas a plaguicidas en comparación con una población control. Sin embargo, según el estudio de Cuenca y Ramírez (2004) no hay una diferencia significativa entre el número de dicéntricos de mujeres expuestas a plaguicidas en comparación a un grupo control, ya que los efectos químicos tóxicos como el de los plaguicidas es fase S dependiente, por lo que en general son efectos a nivel de cromátida y no de cromosomas. Las discrepancias entre estos dos estudios podrían ser explicadas por la edad de las personas participantes, por los polimorfismos genéticos de la población en estudio, por la forma de aplicación, la formulación, las características de aspersion (áreas cerradas o abiertas), el tiempo de exposición a los plaguicidas, o a la interacción de algunas o todas estas situaciones (Gentile *et al.*, 2016). El participante en estudio al momento de la entrevista no indica el tiempo de trabajo como agricultor, tampoco los químicos a los que estuvo expuesto, por lo que no se puede ahondar más sobre el efecto específico de los plaguicidas en el paciente.

Otra posible razón por la que se observan dicéntricos antes del tratamiento es porque en el cáncer se pueden producir dicéntricos; Maser y DePhino (2002) explican que la mayoría de los tumores expresan telomerasas que producen disfunción de los telómeros, esto a su vez provoca que estos cromosomas que sufren disfunción sean unidos por el sistema de reparación del ADN y que por ello se observa un aumento de dicéntricos en estas patologías con relación a la población sin cáncer. Todo lo anterior ocurre en el tumor, pero cuando hay metástasis, que es el caso de este paciente, las células tumorales pasan a sangre periférica y pueden ser detectadas por técnicas de citogenética molecular. Cañizales *et al.* en el 2013 realizó un estudio en pacientes de cáncer de mama en los que, analizando muestras de sangre periférica, encontró aberraciones cromosómicas que también se detectaban en el tumor sólido, lo cual indicaba que había un proceso metastásico o invasivo, y aunque esto podría coincidir con el participante de esta investigación por padecer de un melanoma metastásico, la técnica utilizada en este estudio no

lograría evidenciar células que no sean linfocitos. El resto de los participantes muestran un incremento en el número de cromosomas dicéntricos posterior al tratamiento con radioterapia, lo cual está acorde a lo informado en la literatura (Roch-Lefevre *et al.*, 2014; Hille *et al.*, 2010; Venkatalacham *et al.*, 1999a; Jones *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1989).

El aumento en el número de anillos y fragmentos acéntricos posterior a la radioterapia (cuadro 4 y 5) han sido informados en estudios de dosimetría biológica, lo cual coincide con los resultados encontrados en este trabajo (Roch-Lefevre *et al.*, 2014; Hille *et al.*, 2010; Antoine *et al.*, 1981). Respecto a las anomalías morfológicas observadas, estas podrían corresponder a translocaciones, duplicaciones, deleciones o inserciones. Para corroborar y catalogar cada anomalía encontrada se ocuparía la técnica de bandeado de los cromosomas, lo cual no está contemplando en los objetivos de este trabajo.

Quienes presentaron anomalías morfológicas antes de la radioterapia fueron pacientes con cáncer de mama (cuadros 4 y 5); Rondón, Caicedo y Robledo (2006), encuentran en sus estudios que en pacientes de cáncer de mama en distintos estadios es posible observar alteraciones cromosómicas en sangre periférica, ya sean numéricas o estructurales, como deleciones, derivados, duplicaciones, translocaciones y cromosomas dicéntricos por lo que las anomalías morfológicas observadas podrían estar relacionadas con el tipo de cáncer. Algunos de los rearrreglos cromosómicos más comunes de este tipo de cáncer son $i(1)(q10)$, $der(1;16)(q10;p10)$, $del(3)(p12-13p14-21)$, $del(6)(q21-23)$, $del(1)(p13)$, $del(1)(q11-12)$, $del(1)(p22)$, $i(8)(q10)$, and $del(1)(q42)$ (Heim y Mitelman, 2015), las cuales con tinción de FPG se pueden observar como cromosomas que no coinciden con la morfología normal, lo cual podría explicar lo observado en estos participantes. Para saber si las anomalías morfológicas observadas son cáncer específico debería realizarse una comparación cromosómica con el tumor sólido, ya que se ha observado que las aberraciones observadas en sangre periférica coinciden con las observadas en el tumor (Cañizales *et al.*, 2013; Rondón *et al.*, 2006), pero esto está fuera de los objetivos de esta tesis.

Se sabe que la población de linfocitos periféricos sometidos a estimulación de radiación ionizante no realiza ciclos celulares y se encuentra en la fase G₀, por consiguiente, las aberraciones cromosómicas inducidas por la radioterapia serán de tipo cromosómico, ya que la radiación gamma es de tipo clastógeno S-independiente, contrario a los mutágenos químicos

(como la quimioterapia), que son agentes S-dependientes y producen aberraciones cromatídicas. Es por ello que después de la radioterapia es común observar dicéntricos, fragmentos acéntricos, anillos, translocaciones, deleciones (IAEA, 2014), lo cual coincide con lo observado en esta investigación (Roch-Lefevre *et al.*, 2010; Bilban-Jakopina y Bilban, 2001; Venkatachalam *et al.*, 1999b; Jones *et al.*, 1994; Martin *et al.* 1989). Sin embargo, también se observaron en este estudio fracturas cromatídicas las cuales no son inducidas en linfocitos en G0. Las fracturas cromatídicas son S-dependiente y son atribuibles a la exposición a agentes químicos; como pueden ser la exposición a quimioterapia (OIEA, 2014), esto coincide con lo observado en los participantes que estuvieron bajo quimioterapia antes de iniciar la radioterapia (cuadro 2).

Al momento del estudio dos participantes estaban recibiendo metformina para tratar la diabetes; existe evidencia en modelos animales de que este medicamento tiene efecto genotóxico, produciendo rupturas cromosómicas en hámsters (Morales-Alvarado, 2007). El zoledronato se ha documentado como agente genotóxico produciendo rupturas en el ADN en tres líneas de cáncer (MDA-MB-231, Hs 578T and MCF-7), lo cual podría explicar lo observado en el otro participante (Senaratne *et al.*, 2000).

Las asociaciones satelíticas se han observado tanto en población sana como en pacientes de cáncer y consumidores de tabaco (Pankaj y Bhumika, 2016; Melaragno *et al.*, 1990), este efecto es producido por la asociación de la región organizadora del nucléolo (NOR) localizada en la constricción secundaria de los cromosomas acrocéntricos, y está relacionado con un aumento en la probabilidad de no-disyunciones y translocaciones robertsonianas (Wyandt y Tonk, 2011). En los resultados obtenidos no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el número de asociaciones satelíticas antes y después de la radioterapia, con excepción de dos de los participantes. A pesar de que en estos participantes los valores son estadísticamente significativos, el número de asociaciones satelíticas observadas es muy escaso en comparación con otros estudios donde del 7 al 20% de las metafases observadas presentan asociaciones satelíticas. En este estudio alrededor de 2% de las metafases observadas presentan asociaciones satelíticas, lo cual es mucho menor a lo observado en pacientes sanos (Melaragno *et al.*, 1990; Mattevi y Salzano, 1975).

Para uno de los participantes (cuadro 4), no se obtuvieron metafases antes de la radioterapia, su índice mitótico fue cero, es importante aclarar que en el material analizado de

este participante se observaron núcleos de linfocitos lo que indica que la muestra fue bien cultivada. Un detalle importante, es que, el participante al momento de la toma de la primera muestra se encontraba en tratamiento con quimioterapia, el cual había iniciado cinco días antes de la toma de la primera muestra y terminó siete días después de iniciar el esquema de radioterapia. Es importante aclarar que, aunque había dos pacientes recibiendo quimioterapia al momento de iniciar la radioterapia, cada paciente recibía un esquema de tratamiento diferente. Por lo que el efecto genotóxico del tratamiento con RET, exclusivo para este paciente, pudo ser el causante de la disminución de la cantidad de metafases, ya que se ha visto que el topotecano, componente del tratamiento RET, produce una disminución drástica del índice mitótico desde las 24 horas después de su administración en células de ratón (Aydemir y Bilaloğlu, 2003). Además la quimioterapia genera fragilidad celular en los linfocitos del paciente; lo que produce una disminución de sus valores en sangre, lo que podría explicar lo observado en este participante (Rigaud et al., 1990).

En uno de los participantes se observó un número importante de metafases a las cuales les faltaba un cromosoma G, este paciente es del sexo masculino, y se podría pensar que el paciente tiene una pérdida del cromosoma Y. Esta característica observada se asocia con la edad, ya que en hombres mayores de 60 años pueden presentarse una pérdida del cromosoma Y ya sea en la totalidad de las metafases o en forma de mosaico, y esta característica no se asocia a ninguna patología, ya que se ha observado en personas sanas (Heim y Mitelman, 2015).

Bajo recuento mitótico asociado al tratamiento en pacientes con cáncer de mama.

En este estudio se observó que los pacientes de cáncer de mama presentan un estadio IIA o IIIA (cuadro 6). El estadio IIA, presentado en 3 de los participantes corresponde en la nomenclatura TMN a pacientes con: T0N1M0, T1N1M0 o T2N0M0; y el estadio IIIA presentado en uno de los participantes corresponde en la nomenclatura TNM a pacientes con: T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0 y T3N2M0. Según la clasificación TNM de los estadios IIA y IIIA, todos estos tipos no presentan metástasis a distancia (M0). Sin embargo, estos estadios se consideran etapas tumorales avanzadas porque presentan metástasis en ganglios cercanos al tumor principal (Chabner, Lynch y Longo, 2009). Se sabe de la literatura

que en estas fases el índice mitótico aumenta en el tumor sólido (Gonzalez-Longoria, 2012; Andre et al., 2005). La actividad mitótica se mide como el número de mitosis observadas en un determinado número de campos ópticos, por lo general 10 campos, en cortes histológicos teñidos (Gonzalez-Longoria, 2012; Andre *et al.*, 2005; Poblete, 2001), lo cual no concuerda con la muestra analizada en esta investigación (sangre periférica), en la cual el índice mitótico fue bajo. Esto es debido a que estos pacientes se encontraban bajo tratamiento de quimioterapia, la cual por su efecto genotóxico producen una fragilidad celular en los linfocitos y produce una disminución de sus valores en sangre (Rigaud *et al.*, 1990).

Es de destacar que el participante 1 (cuadro 4), se podría considerar que no tiene un conteo mitótico bajo, ya que fue el único participante en que fue posible analizar más de 500 metafases antes del tratamiento, quedando material extra para análisis, mientras que en todos los demás participantes el material para analizar se agotó sin poder llegar a 500 metafases. En todos se observa una disminución del índice mitótico después de la radioterapia posiblemente producto de la apoptosis en las células lesionadas a nivel de ADN que el sistema de reparación celular no es capaz de reparar (Söderlund, 2009).

El bajo índice mitótico observado es dado por la quimioterapia a la que fueron expuestas las tres participantes. De las tres participantes que recibieron quimioterapia, una utilizaba taxol y las otras trastuzumab (cuadro 3). El taxol afecta los microtúbulos, estabilizando los y suprimiendo la dinámica del huso mitótico, resultando en una inhibición de la alineación cromosómica. La estabilización del huso mitótico permite la unión parcial de los cromosomas al huso mitótico, pero no se puede generar tensión entre los cinetócoros hermanos. La falta de unión o tensión activa una vía de señalización mitótica conocida como el punto de control del huso mitótico que impide el inicio de la anafase hasta que todos los cromosomas estén correctamente alineados. Por lo tanto, el tratamiento con fármacos como el taxol produce un paro en la mitosis, lo que podría explicar el bajo índice mitótico (Vogel, Hager y Holger, 2007). Además, las otras dos participantes presentan el gen HER-2 positivo por lo que son tratadas con Trastuzumab.

HER-2 codifica para receptores de factores de crecimiento, presenta una actividad tirosin quinasa y produce en los pacientes que lo presentan un cáncer más agresivo, con características de tumor de alto grado, pobremente diferenciado, alto índice mitótico e invasión

de ganglios linfáticos. Y un alto índice mitótico está relacionado a un peor pronóstico. Se ha observado que existe una mejoría utilizando tratamientos como trastuzumab, y el utilizar este tipo de medicamentos elimina las células tumorales, con lo que baja el índice mitótico de las células tumorales (Khosravi y Pérez, 2006). Además, por la toxicidad producida por los tratamientos quimioterapéuticos, las células sanguíneas se ven afectadas y se observa una disminución a partir del cuarto día de tratamiento, incluyendo una disminución de la línea linfoide (Coeffic, Antoine & Khayat 2002).

Estimación citogenética de la dosis absorbida

El cálculo de la dosis se realizó utilizando los criterios de análisis del OIEA (2014) y lo comentado por el CPHR, en el cual toman en cuenta metafases con 46 centrómeros. Según el marcador utilizado (dic), ninguno de los nueve participantes del estudio obtuvo una dosis absorbida de cuerpo entero cercana al valor DECE calculado, el cual es entre 4 a 16 veces mayor al calculado con el programa CABAS. Esto pudo ser debido a que se observaron pocos dicéntricos en comparación de estudios similares donde se observan mayor proporción de estos al final del tratamiento (Roch-Lefevre *et al.*, 2014; Hille *et al.*, 2010; Venkatalacham *et al.*, 1999a). Sin embargo, en el estudio de Roch-Lefevre *et al.* (2014) se puede observar que hay pacientes en los que se obtuvo una cantidad de dicéntricos baja, en estos pacientes el estadio de la enfermedad es T1aM0N0 lo que indica un tumor de 1 mm o menos de grosor, sin ulceración o afección ganglionar y sin metástasis, este se clasifica como IA, los participantes IIA y IIIA presentaron más de 100 dicéntricos al final del estudio. Contrario a lo que informa Roch-Lefevre *et al.* los participantes en nuestro estudio son tipo IIA y IIIA, y presentan un bajo número de cromosomas dicéntricos (cuadro 10) lo cual hace pensar que la poca cantidad de dicéntricos que se observaron en nuestra investigación pudo ser debido a la extensión del área irradiada.

En diversos estudios se ha observado que existe una relación entre la cantidad de dicéntricos observados y el área irradiada del paciente, donde, a mayor área irradiada, mayor cantidad de dicéntricos (Roche-Lefevre *et al.*, 2014; Sreedevi *et al.*, 2001; Durante *et al.*, 1999). En este caso no se observó una relación significativa entre el área irradiada y la cantidad de dicéntricos ($r^2= 0.558$; $p= 0,118$) (cuadro 6 y 10). También se analizaron por separado los participantes con el mismo tipo de cáncer, no encontrándose una relación significativa ($r^2=$

0,094; $p= 0,906$), lo que nos indicaría que no existe una relación significativa entre el área irradiada y la dosis calculada con el programa CABAS. Estos resultados no coinciden con la bibliografía consultada.

En este estudio se tomaron en cuenta para el análisis metafases entre 45 y 47 centrómeros, por lo que para el cálculo de dosis con metafases con 46 centrómeros se excluyeron metafases con dicéntricos lo que podría explicar los resultados divergentes con la literatura, sin embargo al realizar el análisis utilizando los datos de metafases entre 45 y 47 centrómeros, se encontró que tampoco existe una correlación entre la dosis calculada y el área irradiada. Lo cual puede ser debido al tamaño de la muestra, ya que en diversas investigaciones se analizaron muestras de más de 11 pacientes de cáncer que presentan el mismo tipo de cáncer, haciendo el análisis más robusto (Roche-Lefevre *et al.*, 2014; Sreedevi *et al.*, 2001; Durante *et al.*, 1999).

Se debe tomar en cuenta que una muestra de sangre periférica va a representar no solo el flujo sanguíneo del área irradiada, sino que también representa la sangre de todo el cuerpo, y si la zona irradiada no tiene suficientes vasos sanguíneos o nódulos linfáticos, el daño puede que no sea observable en sangre periférica. Para los participantes 1, 2, 3 y 4 se contó con el diagrama de volumen que indicaba la fracción de la dosis irradiada que afectaba a cada órgano cercano a la zona irradiada (cuadro 7), en el caso del participante 2, su médula ósea no está afectada, lo cual puede ser el causante de que, aunque tenga el área irradiada más grande (cuadro 7) no se observe la dosis calculada mayor entre los participantes con cáncer de mama.

En la médula ósea la irradiación puede variar la capacidad proliferativa de los precursores hematopoyéticos, responsable de la producción de linfocitos, y producir alteraciones en el índice mitótico, produciendo una disminución en la actividad de la médula ósea, por lo que podría disminuir el índice mitótico. Lassmann *et al.* (2008) indican que para radiación ionizante se ha observado que la médula ósea se ve afectada incluso a dosis bajas (Lassmann *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2004), lo que podría indicar porqué se observan más dicéntricos en los participantes 1, 3 y 4 con respecto al participante 2 (cuadro 5).

Cinco de los participantes fueron expuestos a quimioterapia antes de la radioterapia y esto podría explicar el valor tan bajo de cromosomas dicéntricos observados (cuadro 3 y 4). En un estudio realizado en 1990, se encontró que en pacientes donde se realiza quimioterapia previa a la radioterapia, disminuye significativamente el número de cromosomas dicéntricos y

fragmentos acéntricos, lo cual puede ser debido al bajo índice mitótico producido por los agentes químicos genotóxicos utilizados en la quimioterapia que generan fragilidad celular en los linfocitos del paciente; lo que produce una disminución de sus valores en sangre (Rigaud *et al.*, 1990). No se debe olvidar que el daño por la radioterapia, puede inducir inmediatamente a que se dé reparación celular o apoptosis, y esto podría explicar el no haber observado metafases con suficientes anomalías cromosómicas, y las células que sobreviven son las menos dañadas (Lassmann *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 1994).

Se puede observar como al aumentar el número de metafases el comportamiento de los resultados varía considerablemente, en el (cuadro 9, 10, 11 y 12) se puede observar como al considerar metafases con 45 a 47 centrómeros, se puede calcular con el programa CABAS la dosis parcial total y el porcentaje de cuerpo irradiado, el cual antes no fue posible. Pero aún así el valor calculado está muy por debajo del valor real (cuadro 10 y 12).

Para utilizar la prueba de Dolphin se deben cumplir ciertos supuestos, tales como que el retraso entre la irradiación y la obtención de la muestra de sangre es mínimo, con lo que la producción de dicéntricos no se diluye significativamente debido a la entrada en la circulación de células recién formadas, por lo tanto sin lesiones, provenientes de médula ósea (OIEA 2014). La muestra de cada participante se tomó el último día al finalizar la última sesión de la terapia, por lo que solo se cumpliría el supuesto si se toma en cuenta esta sesión, y el resultado obtenido es cercano a la dosis por sesión (cuadro 10 y 12) , pero cada participante tenía entre 14 a 24 sesiones en las que se habían irradiado entre 1,8 a 2Gy, en las que hubo 24 horas entre sesión y sobrevivieron las células menos dañadas, lo que podría provocar como indica el OIEA (2014) una subestimación de la dosis y de la fracción irradiada del cuerpo.

Además, se debe recordar que el cálculo de la dosis absorbida se realizó con datos de una curva dosis-respuesta que fue construida con datos *in vitro* de participantes sanos, los cuales pueden comportarse de manera diferente al comportamiento celular de pacientes con cáncer y que son irradiados parcialmente; ya que aunque la curva puede calcular la radiación parcial total recibida por el paciente, no toma en cuenta que en radioterapia se dan diversas irradiaciones en forma de fracción cada 24 horas por un intervalo de tiempo que pueden ser entre 15 a 25 días, por lo que los sistemas de reparación celular tienen tiempo de interactuar y reparar las células dañadas o entrar en apoptosis. De manera que las células que se observan en el análisis son las

menos dañadas, lo cual puede generar un sesgo. Por lo general, con las curvas hechas con participantes sanos se calculan dosis más bajas que las reales en pacientes de radioterapia. Por lo que Venkatachalam et al (1999^a) sugiere que la mejor manera de tratar estos casos es por medio de una curva dosis-respuesta realizada con pacientes de radioterapia para obtener un estimado más real (Venkatachalam *et al.*, 1999a).

VIII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró describir los tipos de cromosopatías inducidas por la radioterapia en pacientes con cáncer tratados en el Hospital San Juan de Dios.

1. Las cromosopatías producidas por radioterapia se observan tanto antes como después del tratamiento, lo que cambia es la frecuencia de estas, aumentando después del tratamiento los cromosomas dicéntricos y anillos céntricos. En lo que respecta a fracturas cromatídicas, asociaciones sateliticas y alteraciones morfológicas su frecuencia no se ve afectada por la radioterapia.
2. Los cromosomas dicéntricos, anillos céntricos y excesos acéntricos son un buen biosímetro.
3. Se observó un bajo recuento mitótico que pudieron ser producidas por efecto de la radiación en la médula ósea o por el propio sistema de reparación celular y apoptosis, y en algunos casos por la genotoxicidad producida por tratamientos previos, que puede ser en algunos casos por quimioterapia, en otros casos por medicamentos contra la diabetes.
4. Los pacientes con cáncer de mama presentan el mismo tipo de cromosopatía que los demás participantes, observándose un aumento significativo de dicéntricos después de la radioterapia. No existe relación entre el área irradiada y el número de dicéntricos observado.
4. No existe relación entre el área irradiada y el número de dicéntricos observado.
5. El cálculo de dosis en pacientes de radioterapia no es efectivo si solo se toman muestras antes del tratamiento y en la última sesión de radioterapia porque no toman en cuenta el efecto de lo que sucede cada 24 horas entre cada sesión.
6. La metodología utilizada no es la adecuada para calcular el valor de dosis suministrada, ya que el valor que se obtiene no es cercano al valor calculado por el servicio de radioterapia para

cada paciente. Es importante recalcar la importancia de analizar metafases entre 45 a 47 centrómeros, ya que al descartar metafases se pierde información importante que ayuda a mejorar el cálculo de dosis.

7. Cambiando el criterio de inclusión de las metafases a analizar, los resultados se ajustan mejor al tipo de radiación recibida por el paciente.

8. Es la primera vez en el País que se estandariza la prueba de fluorescencia más Giemsa utilizando BrdU y naranja de acridina, lo que permite contar con una metodología con aplicaciones en dosimetría biológica.

Esta investigación al ser la primera realizada en Costa Rica en el tema de dosimetría biológica abre un camino para futuras investigaciones en el tema, además de nuevas dudas que se pueden esclarecer en trabajos futuros sobre el tema de la radioterapia y la dosimetría biológica que nos ayude a comprender mejor esta área de la ciencia.

IX. RECOMENDACIONES

Debido a las distintas características para cada tipo de cáncer, que producen una fisiopatología y evolución diferente, así como a las diferencias en el tratamiento y de la zona irradiada del cuerpo, se recomienda en futuras investigaciones:

1. Realizar este tipo de investigaciones en pacientes con el mismo diagnóstico y de ser posible con el mismo esquema de tratamiento, incluyendo la misma dosis por fracción y dosis total para poder tener conclusiones que no se vean obstaculizadas por incertidumbres producidas por las diferencias antes mencionadas entre los participantes del estudio.
2. Realizar curvas que tomen en cuenta metafases en un rango más amplio de centrómeros con el fin de evitar la pérdida de información importante que podría cambiar los resultados del análisis.
3. Realizar curvas dosis-respuesta para pacientes con cáncer, que puedan tomar en cuenta las características inherentes de las diversas patologías y consecuencias de tratamientos previos, para así tener un cálculo más preciso de la dosis absorbida.
4. Sembrar más sangre por cultivo y aumentar la cantidad de cultivos por participante para aumentar el número de metafases obtenidas, ya que por las características de los participantes estudiados tienden a presentar un bajo recuento mitótico.

X. GLOSARIO

Aberración estable: Reordenación o intercambio cromosómicos no letales entre cromosomas o dentro de ellos, sin pérdida de material genético, que se produce durante la mitosis.

Aberración inestable: Reordenación cromosómica de una célula que puede ser letal para ella misma o para sus células hijas por dar lugar a la pérdida de material genético o a una transmisión desequilibrada de material genético durante la mitosis.

Acéntrico (ace): Fragmento cromosómico de tamaño diverso que carece de centrómero.

Exceso acéntrico: Los acéntricos formados con independencia de aberraciones dicéntricas anillos céntricos se denominan acéntricos en exceso.

Ácido desoxirribonucleico (ADN): Molécula contenida en los cromosomas donde están codificados los genes responsables de la estructura y la función de un organismo y que hace posible la transmisión de la información genética de una generación a la siguiente.

Anillo (r): Cromosoma circular aberrante que contiene un centrómero, o carece de él, como consecuencia de la unión de dos puntos de rotura en el interior de un cromosoma.

bandeo cromosómico: Técnica de tinción diferencial de los cromosomas en la que por regla general se utiliza el colorante de Giemsa. Según el método utilizado aparecen teñidas de forma selectiva determinadas regiones cromosómicas tales como los centrómeros (bandeo C) o se distinguen pautas características en los brazos (bandeo G). La pauta de bandas oscuras y claras, que es exclusiva de cada pareja de cromosomas, se utiliza para identificarlos y evaluar su estructura.

5-bromodesoxiuridina (BrdU): Análogo de la timidina en el que el grupo metilo que ocupa la posición 5' en la timina ha sido sustituido por bromo. La BrdU se utiliza en dosimetría biológica para marcar el ADN recién sintetizado y así identificar las células que han atravesado el proceso de mitosis más de una vez.

Centrómero: Constricción primaria de los cromosomas que se visualiza durante la mitosis y donde se reúne el par de cromátidas.

Citogenética: Rama de la genética que se ocupa del estudio de los cromosomas.

Colcemid: Compuestos alcaloides que inhiben la formación del huso durante la división celular. Se utilizan para obtener un gran número de células en la metafase, al impedir que pasen a anafase. El Colcemid es un análogo sintético de la colchicina natural, de origen vegetal.

Cromosoma en arlequín: Cromosoma que se ha marcado y teñido de manera diferenciada por haber fijado BrdU durante dos ciclos de replicación. Después de la tinción apropiada, una de las cromátidas aparece oscura y la otra clara.

Curva dosis-respuesta: descripción gráfica o matemática de la relación entre la dosis y el efecto obtenida irradiando in vitro muestras de sangre con dosis conocidas. La curva se utiliza para determinar por interpolación la dosis de radiación absorbida por un individuo potencialmente expuesto.

Dicéntrico (dic): Cromosoma aberrante que tiene dos centrómeros como consecuencia del fallo de la reparación de dos cromosomas rotos.

Efecto determinista: Efecto de la radiación en la salud para el que suele existir un nivel umbral de la dosis por encima del cual la gravedad del efecto es mayor a medida que aumenta la dosis.

Efecto estocástico: Efecto en la salud, inducido por la radiación, cuya probabilidad de darse aumenta al incrementar la dosis de radiación, y cuya gravedad (cuando se produce) es independiente de la dosis. Los efectos estocásticos pueden ser somáticos o hereditarios.

Efectos biológicos: Variedad de posibles consecuencias en materiales vivos, organismos, tejidos o células que, en función del tipo y el grado de daño celular, pueden resultar de la exposición a un agente externo tal como la radiación ionizante.

Exposición: Acto o situación de estar sometido a irradiación.

Genotoxina: Todo agente químico o físico que provoque daños o mutaciones en el material genético.

Gray (Gy): Unidad del SI de kerma y de dosis absorbida, igual a 1 J/kg. Sustituye alrad. 1Gy = 100 rad.

Inserción: Anormalidad cromosómica en la que un fragmento acéntrico de un cromosoma se ha insertado en el brazo de otro cromosoma.

Inversión: Reordenación cromosómica en la que un segmento de un cromosoma se ha invertido enteramente y se ha reinsertado en el mismo punto de rotura. Puede ser pericéntrica o paracéntrica, según si el centrómero está incluido o no en la inversión, respectivamente.

in vitro: Observado o ejecutado en el tubo de ensayo.

in vivo: Observado o ejecutado en el organismo vivo.

Ionización: Proceso físico por el cual uno o más electrones orbitales son expulsados de un átomo o molécula, pasando estos últimos a un estado dotado de carga eléctrica (un ion). El proceso provoca la liberación localizada de una gran cantidad de energía, aproximadamente 33eV por cada ionización, más que suficiente para romper un enlace químico fuerte.

Linfocito: Tipo de leucocito que se encuentra principalmente en la sangre, la linfa y los tejidos linfáticos y que da lugar a las células del organismo dotadas de competencia inmunológica y a sus precursores.

Metafase: Fase de la mitosis del ciclo de las células eucariotas en la que los cromosomas están condensados en su longitud mínima y se alinean en el centro de la célula antes de separarse en las dos células hijas.

Mitosis: Parte del proceso de división celular en la que las células eucariotas separan sus cromosomas en dos conjuntos idénticos.

Radiación gamma: Radiación electromagnética (fotones) de alta frecuencia (longitud de onda muy corta) emitida por el núcleo o por el decaimiento de una partícula o cuando se produce una aniquilación. Los rayos gamma penetran en el tejido más profundamente que las partículas beta o las partículas alfa, pero su transferencia lineal de energía es más baja.

Rotura bicatenaria: Tipo de lesión del ADN; el ADN se rompe completamente debido a la escisión del esqueleto de enlaces fosfodiéster de las dos cadenas de la doble hélice en el mismo locus o en loci próximos.

Rotura monocatenaria: Tipo de lesión del ADN en la que se rompe una sola de las cadenas de la doble hélice.

Telómero: Extremo de los brazos cromosómicos formado por repeticiones en tándem de la secuencia TTAGGG que impiden las fusiones cromosómicas y la formación de cromosomas dicéntricos. Las secuencias teloméricas se pueden perder en los ciclos de replicación del ADN o si se producen microsupresiones en la secuencia.

Translocación: Alteración cromosómica en la que un cromosoma entero o un segmento cromosómico se enlazan a otro cromosoma o segmento cromosómico, o se intercambia con él, de tal modo que el híbrido resultante se segrega conjuntamente en la meiosis

XI. APÉNDICE

Apéndice A: Consentimiento informado brindado, explicado y firmado por los participantes del proyecto.

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA



VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN

COMITÉ ÉTICO CIENTIFICO

Teléfonos:(506) 2511-4201 Telefax: (506) 2224-9367

INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES EN SALUD
INISA

FÓRMULA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

(Para ser participante en una investigación)

Verificación Biológica De Dosis Recibida en Pacientes Tratados Con Radioterapia

Código (o número) de proyecto: _____

Nombre del Investigador Principal: Isabel Castro Volio, MD. MSc.

Nombre del participante: _____

A. PROPÓSITO DEL PROYECTO: esta es una investigación donde participan varios investigadores de varias instituciones: la Universidad de Costa Rica, la Caja Costarricense del Seguro Social y el Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones (CPHR) de Cuba. El objetivo de esta investigación es conocer la frecuencia y los diferentes tipos de cambios en las células de la sangre que son provocados por la radioterapia en pacientes que al igual que usted, son tratados en el Hospital San Juan de Dios. Además queremos averiguar si es posible calcular la cantidad de radiación que usted va a recibir, utilizando una herramienta de dosimetría biológica nunca antes usada en el país. Este método sirve para calcular la cantidad de radiación recibida por una persona, lo que se hace es comparar los cambios encontrados en las células de la sangre de las personas irradiadas, contra una curva de dosis – efecto que tiene el laboratorio.

B. ¿QUÉ SE HARÁ?: su participación consiste únicamente de dos extracciones de una muestra de sangre de la vena del brazo, la primera se hace antes de empezar su tratamiento con la radioterapia y la segunda se hace varias semanas después, cuando termina con todas las sesiones de tratamiento. Se va a llenar un tubo de extracción al vacío, que llena una cantidad aproximada de 10 ml de sangre, es decir, algo menos que una cucharada. Su sangre se va a utilizar toda para esta investigación y no va a sobrar nada.

C. RIESGOS: la participación en este estudio puede significar cierto riesgo o molestia para usted, porque la punzada de la vena para sacar la sangre puede ser dolorosa y puede ser que se forme luego un moretón en el sitio, pero que desaparece al cabo de una semana. No hay riesgo de contaminación ya que se usará material desechable en todo momento. La persona encargada de punzar la vena es experta en este procedimiento.

D. BENEFICIOS: Como resultado de su participación en este estudio, no obtendrá ningún beneficio directo, sin embargo, es posible que los investigadores consigan averiguar la cantidad de radiación a que ha estado expuesta una persona y puede ser que este conocimiento beneficie a otras personas en el futuro.

E. Antes de dar su autorización para participar en este estudio usted debe haber hablado con la Dra. Isabel Castro o con alguno de los investigadores colaboradores y ellos deben haber contestado satisfactoriamente todas sus preguntas. Si quisiera más información más adelante, puede obtenerla llamándola al teléfono 25113293 entre las 8 y las 12 mediodía y entre la 1 y la 6 de la tarde. Además, puede consultar sobre los derechos de los Sujetos Participantes en Proyectos de Investigación al CONIS – Consejo Nacional de Salud del Ministerio de Salud, teléfonos 2233-3594, 2223-0333 extensión 292, de lunes a viernes de 8 a.m. a 4 p.m. Cualquier consulta adicional puede comunicarse a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica **a los teléfonos 2511-4201 ó 2511-5839**, de lunes a viernes de 8 a.m. a 5 p.m.

F. Recibirá una copia de esta fórmula firmada para su uso personal.

G. Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene el derecho de negarse a participar o a interrumpir su participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención médica (o de otra índole) que pudiera requerir.

H. Su participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica pero de una manera anónima.

I. No perderá ningún derecho legal por firmar este documento.

CONSENTIMIENTO

He leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, estoy de acuerdo con ser un participante de investigación en este estudio

Nombre, cédula y firma del participante

Nombre, cédula y firma del testigo

Nombre, cédula y firma del Investigador que solicita el consentimiento

Fecha _____

Apéndice B: Cuestionario realizado a los participantes en la investigación

	Hospital San Juan de Dios Caja Costarricense del Seguro Social Instituto de Investigaciones en Salud Universidad de Costa Rica Proyecto de Investigación Observacional Investigadora principal: Dra. Isabel Castro Volio	
# cédula o asegurado del participante:	Fórmula de recolección de datos del proyecto: “Verificación biológica de la dosis recibida en pacientes tratados con radioterapia en el Hospital San Juan de Dios durante el período 2010-2013”	Página 1 de 2
Código:		Fecha:

Por favor marque con una X donde corresponda

1. La edad del paciente participante es _____ años. **Para poder participar en este estudio debe ser mayor de edad.**

2. El paciente es de sexo femenino masculino

4. El paciente participante
 - fuma
 - no fuma
 - toma bebidas alcohólicas regularmente
 - toma bebidas alcohólicas ocasionalmente
 - nunca toma bebidas alcohólicas
 - toma 4 o más de 4 tazas de café fuerte al día
 - toma menos de 4 tazas de café fuerte al día
 - nunca toma café

5. El paciente participante usa medicamentos regularmente SI SI NO NO
Si la respuesta es NO pase a la pregunta número 7.

6. Esos medicamentos son:

Escriba con letra imprenta el nombre de todos los medicamentos que usa con regularidad, sin olvidar los anticonceptivos hormonales.

7. El paciente participante ha recibido **quimioterapia** en los últimos **tres meses** SI SI NO NO.

8. El paciente participante ha padecido **infecciones virales** en los últimos **tres meses** SI SI NO NO.

# cédula o asegurado del participante:	Fórmula de recolección de datos del proyecto: “Verificación biológica de la dosis recibida en pacientes tratados con radioterapia en el Hospital San Juan de Dios durante el período 2010-2013”	Página 2 de 2
Código:		

9. El paciente o persona participante ha tenido **radiografías** los últimos **tres meses** SI SI
NO NO.
10. El paciente o persona participante ha sido tratada con **radioterapia** en los últimos **dos años** SI SI NO NO.
11. El paciente o persona participante ha sido vacunada en los últimos tres meses SI SI
NO NO.
12. La historia familiar del paciente, con relación al cáncer, hace sospechar una predisposición genética al cáncer (*muchos casos con el mismo tipo o varios tipos de carcinomas, edad de aparición temprana, etc.*) SI SI NO NO.
13. El paciente o persona participante ha sido diagnosticada con alguna enfermedad genética SI SI NO NO. *En caso afirmativo anote el nombre* _____

14. El paciente participante padece alguna enfermedad crónica grave SI SI NO NO. *En caso afirmativo anote el nombre* _____
15. El paciente, por razones de trabajo, se expone a la radiación solar durante buena parte del día SI SI NO NO.
16. El paciente se expone al contacto con agroquímicos (plaguicidas, fertilizantes, herbicidas y similares) por razones de su trabajo SI SI NO NO.
17. El paciente vive en una zona donde se practica la agricultura intensiva y se hace uso constante de agroquímicos SI SI NO NO.
18. El paciente trabaja en instalaciones sanitarias o industriales en contacto cercano con fuentes de radiación (rayos X, etc.) SI SI NO NO.
19. El paciente participante vive o trabaja en ambientes muy contaminados SI SI
NO NO. *En caso afirmativo anote la principal fuente de contaminación* _____

Muchas gracias por su colaboración

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Gutiérrez, M. (2001). *Bioelectromagnetismo: campos eléctricos y magnéticos y seres vivos*. Madrid: Editorial CSIC.
- Ainsbury, E. A., Bakhanova, E., Barquinero, J. F., Brai, M., Chumak, V., Correcher, V y Horn, S. (2010). Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures. *Radiation protection dosimetry*, 147(4), 573-592.
- Alidema, F., & Kryeziu-Alidema, M. (2015). Effects of chemotherapy and value of microscopic changes in lymphocytes of circulating blood on patients with oral cancer treated with chemotherapy. *Apolonia*, (33), 9-13.
- Andre, F., Khalil, A., Slimane, K., Massard, C., Mathieu, M. C., Vignot, S y Spielmann, M. (2005). Mitotic index and benefit of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in patients with early breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 23(13), 2996-3000.
- Antoine, J. L., Gerber, G. B., Leonard, A., Richard, F., y Wambersie, A. (1981). Chromosome aberrations induced in patients treated with telecobalt therapy for mammary carcinoma. *Radiation research*, 86(1), 171-177.
- Aydemir, N., y Bilaloğlu, R. (2003). Genotoxicity of two anticancer drugs, gemcitabine and topotecan, in mouse bone marrow in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 537(1), 43-51.
- Bilban-Jakopin, C., y Bilban, M. (2001). Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on circulating lymphocytes in patients with Hodgkin's disease. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 497(1), 81-88.
- Brenner, D., Curtis, R., Hall, E. y Ron, E. (2000). Second malignancies in prostate carcinoma patients after radiotherapy compared with surgery. *Cancer*. 88(2), 398-406.
- Bushong, S.C. (2013). *Manual de Radiología para técnicos: Física, Biología y protección Radiológica*. (10^{ma} ed.). Madrid: Elsevier.
- Caja Costarricense del Seguro Social. (2011). *Informe Institucional sobre el cáncer en Costa Rica*. San José: Dirección Nacional del Cancer.

- Cao, J., Liu, Y., Sun, H., Cheng, G., Pang, X., y Zhou, Z. (2002). Chromosomal aberrations, DNA strand breaks and gene mutations in nasopharyngeal cancer patients undergoing radiation therapy. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1), 85-90.
- Castro-Volio, I. (2013). Indicadores citogenéticos para la identificación de exposición a radiación ionizante en humanos. 5(3): 110-117.
- Casciato, D. y Territo, M. (2009). *Manual de Oncología Clínica*. (6^{ta} ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Cañizalez, J., Atencio, A. R., Urdaneta, K., Soto, M., Atencio, R., Álvarez, F., y González, R. (2014). Evidencia citogenética de células tumorales circulantes en sangre periférica de mujeres venezolanas con cáncer de mama. *Ciencia*, 21(2): 65-73.
- Chabner, B. A. (2009). Harrison. *Manual de Oncología*. México:McGraw Hill.
- Coeffic, D., Antoine, E. C., y Khayat, D. (2002). Quimioterapia antitumoral. *EMC-Tratado de Medicina*, 6(2), 1-7.
- Cuenca, P., y Ramírez, V. (2004). Aberraciones cromosómicas en trabajadoras expuestas a plaguicidas. *Revista de Biología Tropical*, 52(3), 623-628.
- Danesi, C. C., Bellagamba, B. C., Dihl, R. R., de Andrade, H. H. R., Cunha, K. S., Spanó, M. A., y Lehmann, M. (2010). Mutagenic evaluation of combined paclitaxel and cisplatin treatment in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 696(2), 139-143.
- del Cura, L., Pedraza, S. y Gayete, A. (2009). *Radiología esencial* (tomo 1). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- D'Eredita, G., Giardina, C., Martellotta, M., Natale, T., & Ferrarese, F. (2001). Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution. *European Journal of Cancer*, 37(5), 591-596.
- Dirección Nacional de Cáncer. (2001). *Informe institucional sobre el cáncer en Costa Rica* (N° 001-CCSS-DNC). Caja Costarricense del Seguro Social, dirección Nacional de Cáncer. Recuperado de: www.nacion.com/viva/2001/junio/02/informe.pdf [Consulta 3 mayo del 2015].

- Durante, M., Furusawa, Y., Majima, H., Kawata, T., y Gotoh, E. (1999). Association between Block and Repair of Radiation-Induced Chromosome Fragments in Human Lymphocytes. *Radiation research*, 151(6), 670-676.
- Galle, P. y Paulin, R. (2003). *Biofísica: Radiobiología. Radiopatología*. (1^{ra} ed.). Barcelona: Editorial Masson.
- García, O., Lamadrid, A.I., Morera, L. y Mandina, T. (2005). Introducción y Desarrollo de la Dosimetría Biológica en Cuba. *Nuceus*, 37, 49-53.
- Gentile, N., Bernardi, N., Bosch, B., Mañas, F., y Aiassa, D. (2016). Estudios de genotoxicidad en trabajadores rurales y familias. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(3), 228-239.
- Gershkevitch, E., Hildebrant, G., Wolf, U., Kamprad, F., Realo, E. y Trott, K. (2002). Chromosomal Aberration in Peripheral Lymphocytes and Doses to the Active Bone Marrow in Radiotherapy of Prostate Cancer. *Strahlentherapie und Onkologie*, 178(1), 36-42.
- Gil, O. M., Oliveira, N. G., Rodrigues, A. S., Laires, A., Ferreira, T. C., Limbert, E., y Rueff, J. (2000). No evidence of increased chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes from nonfamilial thyroid cancer patients prior to radiotherapy. *Cancer genetics and cytogenetics*, 123(1), 55-60.
- Giovanetti, A., Sgura, A. y Aversa, G. (2012). *Biological Dosimetry: How to measure the absorbed dose*. [Información técnica]. Sorrento: Italian national Agency for new technologies, energy and sustainable economic development (ENEA). 2012.
- Granados, M. y Herrera, A. (2010). *Manual de Oncología. Procedimientos Médicos Quirúrgicos*. (4^{ta} ed.). México: Mc Graw-Hill.
- Grégoire, V., Langendijk, J. A., y Nuyts, S. (2015). Advances in radiotherapy for head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(29), 3277-3284.
- González-Longoria, L. (2012). Factores pronósticos anatomopatológicos de supervivencia en el cáncer de mama. *MEDISAN*, 16(12), 1899-1905.
- Hall, E. y Wu, C. (2001). Radiation-induced second cancer: the impact of 3D-CRT and IMRT. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 56(1), 83-88.

- Hatayoglu, S. E., y Orta, T. (2007). Relationship between radiation induced dicentric chromosome aberrations and micronucleus formation in human lymphocytes. *Journal of experimental and clinical cancer research*, 26(2), 229.
- Heim, S., y Mitelman, F. (2015). *Cancer cytogenetics: chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells*. París: John Wiley & Sons.
- Hille, A., Hofman-Hüther, H., Kühnle, E., Wilken, B., Rave-Fränk, M., Schmidberger, H., y Virsik, P. (2010). Spontaneous and radiation-induced chromosomal instability and persistence of chromosome aberrations after radiotherapy in lymphocytes from prostate cancer patients. *Radiation and environmental biophysics*, 49(1), 27-37.
- Huber, R., Braselman, H., Geinitz, H., Jaehnert, I., Baumgartner, A., Thamm, R., Figel, M., Molls, M. y Zitzelsberger, H. (2011). Chromosomal radiosensitivity and acute radiation side effects after radiotherapy in tumour patients- a follow up study. *Radiation Oncology*. 6 (1), 32
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2014). *GLOBOCAN 2012; Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. Recuperado de: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. [Consulta 24 de mayo del 2014].
- International Atomic Energy Agency. (1998). *Accidental Overexposure of Radiotherapy Patients in San José, Costa Rica*. Vienna: IAEA.
- International Atomic Energy Agency. (2004). *Accidental overexposure of radiotherapy patients in Białystok*. Vienna: IAEA.
- International Atomic Energy Agency. (2010). *Radiation Biology: A handbook for Teachers and Students*. Vienna: IAEA.
- International Atomic Energy Agency. (2011). *Cytogenetic Dosimetry Application in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies*. Vienna: IAEA.
- Instituto Nacional de estadística y Censos (INEC). 2016. *Incidencia 2014 diferentes características*. En la página: www.inec.go.cr, [consulta 3 de mayo del 2017].
- Jeggio, P. y Loblach, M. (2006). Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair*. 5(9-10), 1192–1198.
- Jones, L. A., Scott, D., Cowan, R., y Roberts, S. A. (1995). Abnormal radiosensitivity of lymphocytes from breast cancer patients with excessive normal tissue damage after

- radiotherapy: chromosome aberrations after low dose-rate irradiation. *International journal of radiation biology*, 67(5), 519-528.
- Kedar, P. (1995). *Handbook of Radiobiology*. (2^{da} ed). Estados Unidos: CRC Press.
- Kirova, Y., Vilcoq, J., Asselain, B., Sastre-Garau, X. y Fouquet, A. (2005). Radiation-induced sarcomas after radiotherapy for breast carcinoma. *Cancer*, 104(4), 856-863.
- Khosravi Shahi, P., y Pérez Manga, G. (2006, March). La relevancia clínica de la sobreexpresión de HER-2 en el cáncer de mama. *Anales de Medicina Interna*, 23(3): 103-104.
- Lassmann, M., Häscheid, H., Chiesa, C., Hindorf, C., Flux, G., y Luster, M. (2008). EANM Dosimetry Committee series on standard operational procedures for pre-therapeutic dosimetry I: blood and bone marrow dosimetry in differentiated thyroid cancer therapy. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 35(7), 1405
- Légal, J. D., De Crevoisier, R., Lartigau, E., Morsli, K., Dossou, J., Chavaudra, N., ... y Parmentier, C. (2002). Chromosomal aberrations induced by chemotherapy and radiotherapy in lymphocytes from patients with breast carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 52(5), 1186-1195.
- Leonard, I., Rueff, J., Gerber, G. y Leonard, E. (2005). Usefulness and limits of Biological Dosimetry Based on Cytogenetic Methods. *Radiation Protection Dosimetry*, 115 (1-4), 448-454.
- López, B., Sáenz, S.M., y Ruiz, M.J. (2008). Dosimetría Biológica: Principios y Utilidad. *Radiobiología*, 8: 186-189. Recuperado de <http://www-rayos.medicina.uma.es/rmf/radiobiologia/revista/Numeros/RB8%282008%29186-189.pdf>. [Consulta 24 de mayo del 2014].
- Manterola, C., & Otzen, T. (2014). Estudios observacionales: los diseños utilizados con mayor frecuencia en investigación clínica. *International Journal of Morphology*, 32(2), 634-645.
- Martin, R. H., Rademaker, A., Hildebrand, K., Barnes, M., Arthur, K., Ringrose, T., y Douglas, G. (1989). A comparison of chromosomal aberrations induced by in vivo radiotherapy in human sperm and lymphocytes. *Mutation Research Letters*, 226(1), 21-30.
- Matsubara, S., Horiuchi, J., Okuyama, T., Takeda, M., Shibuya, H., Suzuki, S., y Kishi, K. (1985). Chromosome aberrations in the peripheral lymphocytes induced by brachytherapy

- and external cobalt teletherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 11(6), 1085-1094.
- Mattevi, M. S., y Salzano, F. M. (1975). Effect of sex, age and cultivation time on number of satellites and acrocentric associations in man. *Humangenetik*, 29(4), 265-270.
- Merck Sharp y Dohme (2010) *Manual Merck de información médica general*. (volumen 1). España: Editorial Océano.
- Melaragno, M. I., y Smith, M. D. A. C. (1990). Sister chromatid exchange and proliferation pattern in lymphocytes from newborns, elderly subjects and in premature aging syndromes. *Mechanisms of ageing and development*, 54(1), 43-53.
- Montoro, A., Rodriguez, P., Almonacid, M., Villaescusa, J., Verdu, G., Caballín, M., Barrios, L. y Barquinero, J. (2005). Biological Dosimetry in a group of radiologists by the analysis of dicentrics and translocations. *Radiation Research*, 164(5), 612-617.
- Morales-Alvarado, J., Murga-Valdez, M., Moreno-Luján, J., López-Deza, E., Gutiérrez-Bustamante, J., y Sánchez-Reyna, V. (2007). Efecto genotóxico de la glibenclamida, metformina y terapia combinada en línea celular de ovario de hámster. *CIMEL*, 12(2), 47.
- Navarro Fernández, J., Alcaraz Baños, M., Gómez Moraga, A., Vicente Ortega, V., y Canteras Jornada, M. (2004). Actividad genotóxica de la terapia con I131 en pacientes tratados por carcinomas de tiroides. *Oncología (Barcelona)*, 27(1), 40-48.
- NCD Risk Factor Collaboration. (2016). A century of trends in adult human height. *Elife*, 5, e13410.
- Obe, G. y Vijayalaxmi, H. (2007). *Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health*. Alemania: Springer- Verlag.
- Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). (2014). *Dosimetría citogenética: Aplicaciones en materia de preparación y respuesta a las emergencias radiológicas*. Vienna: OIEA.
- Organización Internacional del Trabajo (OIT). (2001). *Enciclopedia de Salud y Seguridad del Trabajo*. (Parte VI, capítulo 48). [versión digital]. Recuperado de <http://www.insht.es/portal/site/Insht/menuitem.1f1a3bc79ab34c578c2e8884060961ca/?vgnnextoid=5f5b4cf5a69a5110VgnVCM100000dc0ca8c0RCRD&vgnnextchannel=9f164a7f8a651110VgnVCM100000dc0ca8c0RCRD> [Consulta 2 de enero del 2014].

- Ortega, E. y Aguilar, A. (2010). DJ-3317 (oficio 08029). *Contraloría General de la República. Costa Rica*. Recuperado de: documentos.cgr.go.cr/content/dav/jaguar/sad_docs
- Pankaj G., y Bhumika D. (2016), Frequency of Satellite Associations of Acrocentric Chromosomes in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients after 5-FU and Cisplatin Treatments, *International Journal of Molecular Medical Science*, 6(1): 1-5.
- Pass, B. (1997). Collective Radiation Biodosimetry for Dose Reconstruction of Acute Accidental Exposures: A Review. *Environmental Health Perspective*, 105 (Supl 6), 1397-1402.
- Poblete, M. T. (2001). Marcadores de utilidad en cáncer mamario. *Cuad. cir(Valdivia)*, 15(1), 74-79
- Prasad, K. (1995). *Handbook of Radiobiology*. (2^{da}. ed.). Estados Unidos: CRC Press.
- Prieto M.J., Moreno, M., Nava, P., Zapata, L., y Herranz, R. (2007). Investigación, mediante técnicas de dosimetría biológica, de posibles efectos sobre la salud por causa de las radiaciones ionizantes de profesionales de líneas aéreas. Estudio poblacional. *La Mutua*, 18, 93-109.
- Ramesh, K. H., y Bhargava, M. K. (1992). Cytogenetic damage in peripheral blood lymphocytes of cancer patients prior to radiotherapy. *Cancer genetics and cytogenetics*, 60(1), 86-88.
- Rigaud, O., Guedeney, G., Duranton, I., Leroy, A., Doloy, M. T., y Magdelenat, H. (1990). Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on the circulating lymphocytes of breast cancer patients. I. Chromosome aberrations induced in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 242(1), 17-23.
- Roch-Lefèvre, S., Pouzoulet, F., Giraudet, A. L., Voisin, P., Vaurijoux, A., Gruel, G., y Bourhis, J. (2014). Cytogenetic assessment of heterogeneous radiation doses in cancer patients treated with fractionated radiotherapy. *The British journal of radiology*, 83(993), 759-766
- Rondón, M., Caicedo, J., y Robledo, J. F. (2006). Determinación de anomalías cromosómicas y secuencias de ADN amplificadas en cáncer de mama. *Revista Ciencias de la Salud*, 4(2), 7-22.
- Roque, V. (2007). Valoración del Estado de Nutrición en el Paciente con Cáncer. *Cancerología*, 2, 315-326.

- Roychoudhuri, R., Evans, H., Robinson, D. y Moller, H. (2004). Radiation –induced malignancies following radiotherapy for breast cancer. *British Journal Cancer*, 91(5), 868-872.
- Rozgaj, R., Kašuba, V. y Šimic, D. (2002). The frequency of dicentrics and acentrics and the incidence of rogue cells in radiation workers. *Mutagenesis*, 17(2), 135-139.
- Rydberg, B. (2001). Radiation-induced DNA damage and chromatin structure, *Acta Oncologica*, 40, 682–685.
- Senaratne, S. G., Pirianov, G., Mansi, J. L., Arnett, T. R., & Colston, K. W. (2000). Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer*, 82(8), 1459.
- Sevan'kaev, A., Tsyb, A., Lloyd, D., Zhloba, A., Moiseenko, V., Skrjabin, A. y Klimov, V. (1993). Rogue cells observed in children exposed to radiation from the Chernobyl accident. *International Journal Radiation Biology*, 63(3), 361-371.
- Söderlund, K. (2009). *DNA repair pathways and the effect of radiotherapy in breast cancer*. Linköping: LiU-Tryck.
- Sotelo, S., Sánchez, P., Carrasco, J. A., González, P., y Páramo, C. (2013). Parámetros antropométricos en la evaluación de la malnutrición en pacientes oncológicos hospitalizados: utilidad del índice de masa corporal y del porcentaje de pérdida de peso. *Nutrición Hospitalaria*, 28(3), 965-968.
- Sreedevi, B., Rao, B. S., Nagaraj, H., y Pal, N. K. (2001). Chromosome aberration analysis in radiotherapy patients and simulated partial body exposures: biological dosimetry for non-uniform exposures. *Radiation protection dosimetry*, 94(4), 317-322.
- Steffler, C. (2007). The ICRP 2007 recommendations. *Radiation protection dosimetry*, 127(1-4), 2-7.
- Tawn, E. J., Whitehouse, C. A., y Martin, F. A. (2000). Sequential chromosome aberration analysis following radiotherapy—no evidence for enhanced genomic instability. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 465(1), 45-51.
- Tresserra, F., Martínez, M. Á., González-Cao, M., Rodríguez, I., Viteri, S., Baulies, S., y Fábregas, R. (2013). Respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante: correlación

- entre 2 sistemas de gradación histológica. *Revista de Senología y Patología Mamaria*, 26(3), 77-84.
- Tinwell, H., y Ashby, J. (1994). Genetic toxicity and potential carcinogenicity of taxol. *Carcinogenesis*, 15(8), 1499-1501.
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Travis, L., Andersson, M., Gospodarowicz, M., van Leeuwen, F., Bergfedt, K., Lynch, C., Curtis, R., Kohler, B., Wiklund, T., Storm, H., Holowaty, E., Hall, P., Pukkala, E., Sleijfer, D., Clake, E., Boice Jr, J., Stovall, M. y Gilbert, E. (2000). Treatment-Associated leukemia following testicular cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(14), 1165-1171.
- Valenzuela-Landaeta, K., Rojas, P., y Basfi-fer, K. (2012). Evaluación nutricional del paciente con cáncer. *Nutrición hospitalaria*, 27(2), 516-523.
- Vallerga, M.B., Fadel, A., Rojo, A.M., Taja, M.R., Deluca, G., Cabrejas, M., Valdivieso, C. y Di Giorgio, M. (2008). Dosimetría biológica de pacientes con carcinoma diferenciado de tiroides tratados con Iodo-131. *Primer Congreso Americano del IRPA (International Radiation Protection Association)*. Acapulco. (641-653).
- Venkatachalam, P., Solomon, F. P., Prabhu, B. K., Mohankumar, M. N., Gajendiran, N., y Jeevanram, R. K. (1999a). Estimation of dose in cancer patients treated with fractionated radiotherapy using translocation, dicentric and micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 429(1), 1-12.
- Venkatachalam, P., Paul, S. F., Mohankumar, M. N., Prabhu, B. K., Gajendiran, N., Kathiresan, A., y Jeevanram, R. K. (1999b). Higher frequency of dicentric and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 425(1), 1-8.
- Vogel, C., Hager, C., y Bastians, H. (2007). Mechanisms of mitotic cell death induced by chemotherapy-mediated G2 checkpoint abrogation. *Cancer Research*, 67(1), 339-345.
- Wojcik, A., Stephan, G., Sommer, S., Buraczewska, I., Kuszewski, T., Wiczorek, A., y Gózd, S. (2003). Chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes of breast cancer

patients after an accident during radiotherapy with 8 MeV electrons. *Radiation research*, 160(6), 677-683.

Wyandt, H. E., y Tonk, V. (2011). *Human chromosome variation: heteromorphism and polymorphism*. Nueva York: Springer Science & Business Media.