

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

GENERACIÓN DE UNA CURVA PRELIMINAR DE EFECTO BIOLÓGICO EN FUNCIÓN DE LA DOSIS ABSORBIDA, MEDIANTE LA IRRADIACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA EN UN MANIQUÍ DE AGUA CON UNA FUENTE RADIATIVA DE COBALTO-60, UTILIZANDO EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS.

Tesis sometido a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Física para optar al grado y título de Maestría Académica en Física-Médica.

RÓNALD CARRILLO PANIAGUA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

Dedicatoria

A mi madre Jenny, la niña que se convirtió en mujer y me trajo al mundo a pesar de todas las improbabilidades. Quien me enseñó a ser siempre fuerte, positivo, trabajador, empático y honesto.

A mi abuelita Virginia, el ser humano que me amó con el amor más puro que ha existido; quien me enseñó a amar sin pedir nada a cambio, a ver el mundo con inteligencia emocional, integridad y humildad.

Todo lo bueno que tengo, ha sido por ellas.

Agradecimientos

A Patricia Mora, por toda la sabiduría y entereza que me ha transmitido durante tantísimos años de estudio y trabajo.

A Luisa Valle, por darme la oportunidad de colaborar en uno de los campos que desde niño me apasiona, y guiarme con su calidez cada vez que me sentía perdido.

A Melissa Vázquez, por su constante apoyo y eterna disposición.

A David Solano, por sus consejos.

A Marvin Rodríguez, por su confianza, por su ayuda, por su conocimiento, paciencia y benevolencia.

Al Dr. Pablo Ordóñez por su consentimiento y confianza.

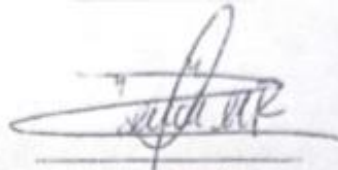
A Priscilla Redondo, por su cooperación y enorme aporte en la elaboración de este proyecto.

A los colegas y compañeros del INISA, especialmente a Fernando Ortiz, Alejandra Vargas y Nelson Brenes por su gran ayuda en distintas maneras.

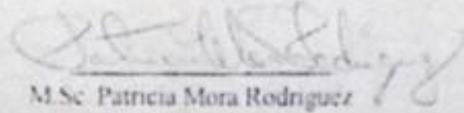
A Omar García y Jorge Ernesto del Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones de Cuba, así como a Marina Digiorgio de la Autoridad Regulatoria Nuclear de Argentina, por sus aclaraciones en todas las consultas que surgieron durante esta investigación.

Hoja de aprobación

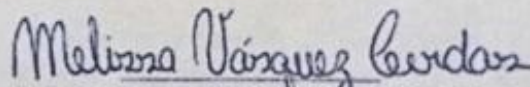
“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Física de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Física Médica”



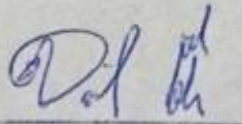
Dr. Erick Mora Ramirez
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado



M.Sc. Patricia Mora Rodriguez
Profesora Guía



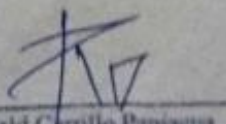
M.Sc. Melissa Vásquez Cerdas
Lectora



M.Sc. David Solano Solano
Lector



Dr. Jorge Arturo Gutiérrez Camacho
Director Programa de Posgrado en Física



Ronald Carrillo Paniagua
Sustentante

Tabla de contenido

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación.....	iv
Resumen	vii
Abstract.....	vii
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de abreviaturas	xi
1. Introducción	1
2. Objetivos	4
3.1. Objetivo General.....	4
3.2 Objetivos Específicos	4
3. Contextualización y antecedentes	5
4. Marco Teórico	12
5. Metodología	22
5.1. Construcción del soporte para las muestras de sangre.....	22
5.2 Aprobación de cursos y talleres	23
5.3 Permisos de uso del equipo e instalaciones	24
5.4 Donantes de sangre	24
5.5 Toma, colocación y transporte de las muestras de sangre	24
5.6 Condiciones de irradiación	26
5.6.1 Condiciones de irradiación propias del equipo de teleterapia.....	27
5.6.2 Condiciones de irradiación para el maniquí de agua.....	28
5.7 Siembra y cosecha celular.....	31
5.8 Análisis de células binucleadas de linfocitos mediante microscopio óptico	32
6. Resultados	36
6.1 Resultado 1: Validación del maniquí de agua adquirido por el Instituto de Investigaciones en Salud.....	36
6.2 Resultado 2: Determinación del efecto biológico producido en las muestras de sangre periférica, debido a la irradiación in-vitro con rayos gamma de una fuente radiactiva de Co-60.....	43

6.3 Resultado 3: Establecimiento de la relación dosis–respuesta mediante la generación de una curva de efecto biológico en función de diferentes dosis de rayos gamma, con base en el Modelo Lineal-Cuadrático.	46
7. Discusión	51
8. Conclusiones	66
9. Recomendaciones.....	67
10. Impacto del proyecto	67
11. Referencias	68

Resumen

En este documento se plantea el desarrollo de una tesis enfocada en la generación de una curva preliminar de efecto biológico en función de la dosis absorbida, mediante la irradiación de muestras de sangre periférica, con una fuente radiactiva de Cobalto-60 del Servicio de Radioterapia del Hospital San Juan de Dios. El objetivo de esta metodología es la implementación de ensayos de dosimetría biológica en el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) de la Universidad de Costa Rica¹.

Abstract

In this document is proposed the development of a thesis focused on the generation of a preliminary curve of biological effect as a function of the absorbed dose, by irradiating peripheral blood samples, with a radioactive source of Cobalt-60 from the Service of Radiotherapy of the Hospital San Juan de Dios. The objective of this methodology is the implementation of biological dosimetry tests at the Institute of Health Research (INISA) of the University of Costa Rica.

¹ El INISA, ubicado en la Ciudad de la Investigación de la Universidad de Costa Rica, tiene como misión contribuir a fomentar y mantener la salud humana mediante la investigación científica, la docencia y la divulgación dentro de un marco integral y ético. Disponible en <http://www.inisa.ucr.ac.cr/>

Lista de tablas

Tabla 1.....	21
Tabla 2.....	34
Tabla 3.....	38
Tabla 4.....	41
Tabla 5.....	42
Tabla 6.....	45
Tabla 7.....	46
Tabla 8.....	47
Tabla 9.....	49
Tabla 10	54
Tabla 11	59
Tabla 12	60
Tabla 13	63

Lista de figuras

Figura 1	1
Figura 2	5
Figura 3	7
Figura 4	8
Figura 5	8
Figura 6	10
Figura 7	15
Figura 8	16
Figura 9	16
Figura 10	22
Figura 11	23
Figura 12	25
Figura 13	25
Figura 14	26
Figura 15	27
Figura 16	28
Figura 17	29
Figura 18	30
Figura 19	32
Figura 20	32
Figura 21	33
Figura 22	33
Figura 23	35
Figura 24	37
Figura 25	39
Figura 26	41
Figura 27	43
Figura 28	44
Figura 29	45
Figura 30	47
Figura 31	48

Figura 32.....	56
Figura 33.....	58
Figura 34.....	62

Lista de abreviaturas

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ALARA:	Tan bajo como sea razonablemente posible
CBMN:	Prueba de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis
CBN:	Célula Bi-nucleada
CPE:	Equilibrio de partículas cargadas
FISH:	Hibridación fluorescente in situ
INISA:	Instituto de Investigaciones en Salud
KERMA:	Kinetic Energy Released in Matter
LBDNet:	Red Latinoamericana de Dosimetría Biológica
MLQ:	Modelo Lineal Cuadrático
MN:	Micronúcleos
NIST:	National Institute of Standards and Technology
NP:	Núcleo Principal
OEM:	Ondas Electromagnéticas
OIEA:	Organismo Internacional de Energía Atómica
POE:	Personal Ocupacionalmente Expuesto a radiaciones
RI:	Radiación (es) Ionizante (s)
SSD:	Distancia de la fuente a la superficie
TLE:	Transferencia Lineal de Energía
UCR:	Universidad de Costa Rica



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Rónald Carrillo Paniagua, con cédula de identidad 701750583, en mi condición de autor del TFG titulado Generación de una curva preliminar de efecto biológico en función de la dosis de sorbida, mediante la irradiación de muestras de sangre periférica, utilizando el ensayo de microaúculos.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Rónald Carrillo Paniagua

Número de Carné: AS1247 Número de cédula: 701750583

Correo Electrónico: ronald.carrillo@ucr.ac.cr

Fecha: 14/12/2020 Número de teléfono: 7203 3380

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): _____

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1. Introducción

En 1865, James C. Maxwell publica un conjunto de cuatro ecuaciones que describen los fenómenos electromagnéticos, actualmente conocidas como “Ecuaciones de Maxwell” (Griffiths, 2017, p. 326). La Figura 1 muestra este grupo de ecuaciones en su forma diferencial aplicadas al espacio vacío.

Figura 1

Ecuaciones de Maxwell en forma diferencial para el espacio vacío.

$$\begin{aligned}\vec{\nabla} \cdot \vec{E} &= \frac{\rho}{\epsilon_0} \\ \vec{\nabla} \cdot \vec{B} &= 0 \\ \vec{\nabla} \times \vec{E} &= -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \\ \vec{\nabla} \times \vec{B} &= \mu_0 \vec{J} + \mu_0 \epsilon_0 \frac{\partial \vec{E}}{\partial t}\end{aligned}$$

Fuente: Griffiths, D. (2017).

A partir del desarrollo de dichas ecuaciones, se realiza una enorme cantidad de experimentos y avances tecnológicos relacionados con ondas electromagnéticas (OEM) de diversas energías, y posteriormente, estas fueron agrupadas en todo un espectro electromagnético que va desde las ondas de radio, cuya energía es la menor de todo el espectro, hasta los rayos gamma, los cuales poseen la mayor energía de todas las formas de radiación. Al considerar la energía que transporta cada tipo de OEM, se ha realizado una sub-clasificación de dichas ondas: radiaciones que no son ionizantes (de poca energía) frente a radiaciones que son ionizantes (RI).

Con el avance de la ciencia y la tecnología, han aumentado las aplicaciones pacíficas y beneficiosas de las radiaciones ionizantes en ámbitos industriales, médicos y de

investigación. Estas aplicaciones, a pesar de estar rigurosamente estudiadas y controladas, siempre conllevan un riesgo que normalmente es mucho menor a los beneficios obtenidos, y por tanto, se acepta pero se cuantifica responsablemente.

La mayor parte del tiempo, gracias a los estrictos protocolos de seguridad radiológica, las aplicaciones pacíficas de las radiaciones son realizadas exitosamente y no hay sobreirradiaciones en el personal expuesto, sin embargo, y desgraciadamente, en algunos escenarios el personal ocupacionalmente expuesto a radiaciones (POE) o los pacientes tratados, han sido sobre irradiados con distintos tipos de RI. Entre ellos, se conocen los casos del Accidente Nuclear de Chernóbil (Arredondo, 2006), el Accidente Nuclear de Fukushima (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2015) e incluso el accidente radiológico ocurrido en nuestro país, Costa Rica, en 1996: la sobre irradiación de pacientes en el Servicio de Radioterapia del Hospital San Juan de Dios (Organismo Internacional de Energía Atómica, 1999).

En el momento de ocurrencia de los accidentes mencionados, no existían mecanismos tan precisos como los actuales para cuantificar de forma eficaz la dosis que absorbió cada una de las personas involucradas, y a pesar de que actualmente los dispositivos y protocolos de seguridad han mejorado enormemente su robustez, la posibilidad de una irradiación accidental, aunque sea muy baja, siempre está presente.

Cabe destacar que la necesidad de cuantificar con precisión las dosis absorbidas en personal ocupacionalmente expuesto a RI o en pacientes, no se da solamente en casos de accidente, sino que es parte de los protocolos de Protección Radiológica a seguir en cualquier instalación nuclear o radiológica. Por estas razones es que toda instalación nuclear o radiológica debe contar con una dosimetría física metrológicamente trazable (International Atomic Energy Agency, 2004), es decir, una manera de cuantificar la dosis absorbida utilizando algún sensor o dispositivo que sirva como dosímetro, el cual es portado rutinariamente por el personal mientras este se expone a las RI.

Parte de la responsabilidad de cada usuario, con respecto a los dosímetros físicos, es portar el dispositivo siempre que esté en presencia de RI, sin embargo, en ocasiones los dosímetros no son utilizados regularmente o se dejan olvidados (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2016a), por lo que la cuantificación de la dosis ocupacional absorbida en la persona no puede realizarse exitosamente.

Analizando todas estas consideraciones, surge la necesidad de contar con un dosímetro que no pueda ser alterado u olvidado en el día a día, y que esté correlacionado directamente con algún efecto biológico ocurrido en el organismo de la persona irradiada. A este campo se le llama “dosimetría biológica” y es ampliamente estudiada por la radiobiología.

El objetivo fundamental de esta tesis fue desarrollar una ecuación que permita correlacionar los efectos biológicos producidos en una persona irradiada, con la cantidad de dosis a la cual fue expuesta; es decir, una curva de efecto biológico. Al contar con una curva de efecto biológico se podrá cuantificar la dosis recibida por cada persona irradiada, y de esta manera, a partir de una muestra de su sangre, conocer cuánta dosis recibió y consecuentemente los lineamientos médicos a seguir según la severidad del caso.

2. Objetivos

3.1. Objetivo General

Generar una curva preliminar de efecto biológico en función de la dosis absorbida, mediante la irradiación de muestras de sangre periférica en un maniquí de agua con una fuente radiactiva de Cobalto-60, utilizando el ensayo de micronúcleos (MN).

3.2 Objetivos Específicos

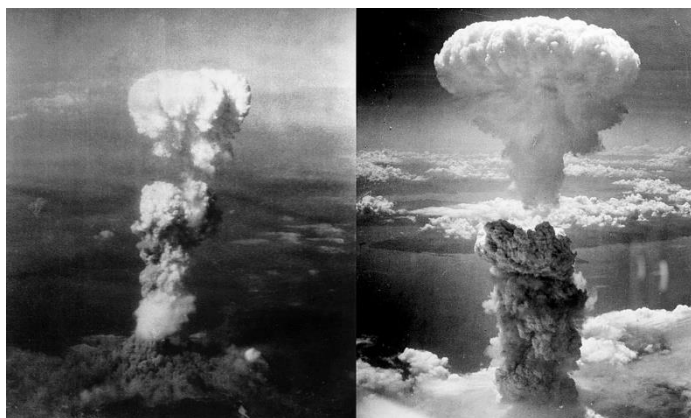
1. Validar el maniquí de agua adquirido por el INISA de tal manera que cumpla con los requisitos dosimétricos establecidos por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) para la irradiación de muestras de sangre.
2. Determinar el efecto biológico producido en las muestras de sangre periférica, debido a la irradiación in-vitro con rayos gamma de una fuente radiactiva de Co-60.
3. Establecer una relación dosis–respuesta mediante la generación de una curva de efecto biológico en función de diferentes dosis de rayos gamma, con base en el Modelo Lineal-Cuadrático.

3. Contextualización y antecedentes

Con el desarrollo de la Física Nuclear mediante las teorías amparadas en la Mecánica Cuántica, y un gran auge en los avances tecnológicos y la ingeniería de materiales, las aplicaciones de la energía nuclear aumentaron enormemente, algunas de ellas con finalidades pacíficas como la generación de energía eléctrica, y otras, desgraciadamente, con finalidades bélicas como las explosiones nucleares ocurridas en Hiroshima y Nagasaki (1945), mostradas en la Figura 2. (Thomas, G. & Morgan, M., 2006).

Figura 2

Fotografías de las explosiones nucleares en Hiroshima y Nagasaki, respectivamente, durante la Segunda Guerra Mundial.



Fuente: Thomas, G. & Morgan, M. (2006).

En todas las aplicaciones de la energía nuclear, normalmente la cantidad de radiación ionizante expulsada es mucho mayor que el promedio mundial de la RI de origen natural, el cual es cercano a los 2 mSv anuales (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2016b). Regularmente el personal ocupacionalmente expuesto a las radiaciones ionizantes cumple con las normas de seguridad establecidas para el resguardo de su integridad, basándose en los tres pilares de la Protección Radiológica (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2016a)

a. Justificación de la práctica: Si se realiza una práctica que conlleve el uso de RI, debe haber un beneficio neto para la sociedad.

b. Optimización de la dosis: todas las exposiciones a la RI deben ser tan bajas como sean razonablemente alcanzables. Este pilar es conocido por sus siglas en inglés como ALARA (As Low as Reasonably Achievable).

c. Limitación de la dosis: las dosis absorbidas por las personas no debe superar los límites establecidos por la entidad reguladora de cada país.

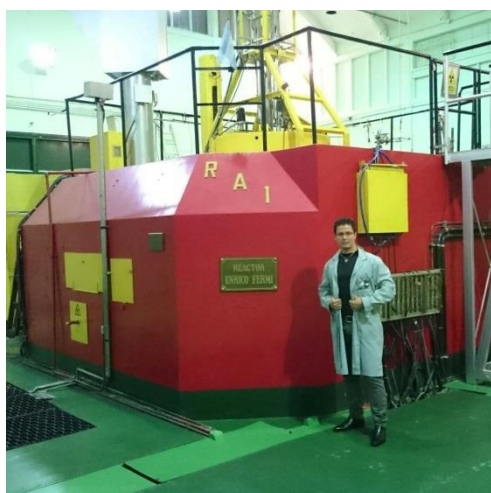
A pesar de que todos los gobiernos y compañías nucleares velan por el cumplimiento de los pilares de radioprotección y las normas de seguridad, los accidentes siempre tienen cierta probabilidad de ocurrencia y desgraciadamente llegan a producirse, como fue en el caso de Chernóbil en 1986 (Arredondo, 2006), Fukushima en 2011 (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2015), o accidentes de criticidad similares al del reactor RA-2 en el Centro Atómico Constituyentes de Argentina, en 1983 (United States Nuclear Regulatory Commission, 1983). En todos estos escenarios, mostrados en la Figura 3, las dosis absorbidas fueron desde las decenas de gray hasta incluso cientos de gray, produciendo efectos biológicos severos en la mayoría de los afectados y siendo letales en muchos de ellos.

Figura 3

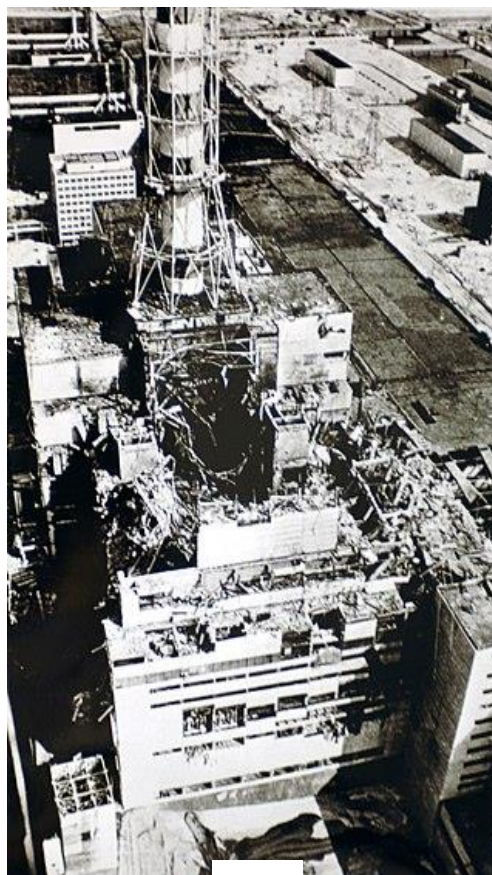
A. Explosión del accidente nuclear de Fukushima. B. Reactor del Centro Atómico Constituyentes. C. Accidente nuclear de Chernóbil.



A



B



C

Fuente: United States Nuclear Regulatory Commission. (1983)

Además de las aplicaciones de las RI en reactores nucleares, hay muchas otras aplicaciones médicas donde la RI es el principal actor, entre ellas la Medicina Nuclear, la generación por imágenes de rayos X y la Radioterapia (Organismo Internacional de Energía Atómica, Organización Mundial de la Salud y Organización Panamericana de la Salud, 2010). En esta última aplicación es donde se absorbe la mayor cantidad de radiación en los tejidos, y al igual que las aplicaciones industriales o de generación de energía, no está exenta de percances, como lo fue el Accidente Radiológico del Hospital San Juan de Dios en Costa Rica. En la Figura 4 se muestra el efecto de la sobreirradiación de un paciente en dicho accidente (Organismo Internacional de Energía Atómica, 1999).

Figura 4

Paciente con epilación permanente debido al exceso de radiación.



Fuente: Organismo Internacional de Energía Atómica. (1999).

En la Figura 5 se muestra dos personas con cáncer de tiroides atribuibles al accidente de Chernóbil (National Geographic, 2019)

Figura 5

Pacientes con cáncer de tiroides, presuntamente atribuidos a la sobre exposición de radiación en Chernóbil.



Fuente: National Geographic. (2019).

Estos efectos nocivos que producen las radiaciones ionizantes sobre los tejidos y órganos de los seres vivos se vienen analizando desde hace décadas (Paz y Miño, C. y López-Cortés, A., 2014). Su desarrollo no ha sido sencillo pues toda investigación con seres humanos se obstaculiza especialmente por la gran cantidad de requisitos, papeleo y condiciones burocráticas o bioéticas que se les impone a los investigadores, limitando los análisis radiobiológicos al estudio de casos donde las personas fueron expuestas ya sea en las explosiones nucleares (Hiroshima y Nagasaki) o accidentes radiológicos ocurridos en reactores nucleares, hospitales o industria (Galle, P. y Paulin, R., 2003).

A pesar de las limitantes, expertos en radiobiología a nivel mundial han estudiado profundamente las lesiones producidas por la interacción de la radiación con los seres vivos, y por esta razón, la normativa del Organismo Internacional de Energía Atómica (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2016b). Establece como requisito indeleble la cuantificación de la dosis absorbida en las personas involucradas. Esta necesidad se fundamenta en tres principales razones. La primera, cumplir con los protocolos de radioprotección de toda central nuclear o instalación radiológica para la seguridad del personal ocupacionalmente expuesto. La segunda, evaluar la dosis absorbida por pacientes sometidos a terapia con radiación (radioterapia, medicina nuclear o radiodiagnóstico). La tercera, estimar rápidamente las dosis absorbidas en caso de explosiones nucleares o accidentes radiológicos.

En el caso de nuestro país, la Universidad de Costa Rica (UCR) ha trabajado durante años para establecer un servicio de Dosimetría Biológica con el cual medir las dosis de personas irradiadas. El proyecto se ha llevado a cabo con fondos de la UCR y con cooperación del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), esto en el marco del Proyecto Nacional RLA/9/076 (Ministerio de Salud, 2014), llamado “Establecimiento de un Servicio de Dosimetría Biológica en Costa Rica”, el cual, de hecho, es el primero de Centroamérica (García, V., 2019)

Además de los esfuerzos nacionales en el ámbito de la dosimetría biológica, existe una entidad llamada “Red Latinoamericana de Dosimetría Biológica” (LBDNet)², en la cual se halla adscrita Costa Rica, específicamente con el laboratorio del INISA. La LBDNet se encarga de fomentar los estudios en este campo y una de las consignas a futuro es que cada

²Disponible en <http://www.cphr.edu.cu/LBDNet/index.html>

laboratorio posea sus propias curvas de calibración. Estas curvas son ecuaciones que permiten predecir la cantidad de radiación que ha llegado a un individuo, a partir de análisis estadísticos producidos. Como en ocasiones las curvas no poseen una población estadística suficientemente grande para disminuir las incertidumbres asociadas, estas curvas son llamadas “Curva preliminar” en el sentido de que aún no tienen el carácter de “Curva de Calibración”. Aun así, existe la ventaja de que conforme pase el tiempo y aumenten los análisis, se pueden añadir resultados de nuevos voluntarios sanos para mejorar la robustez de la población estadística, y eventualmente lograr el carácter de Curva de Calibración.

Durante el periodo de enero a abril de 2018 se colaboró con el UINISA en la adquisición de un maniquí de agua para colocar las muestras de sangre y realizar las irradiaciones. Su compra se llevó a cabo gracias a fondos brindados por el OIEA. Como actualmente no existen proveedores de maniqués de agua para irradiación de sangre en Costa Rica, se analizó la posibilidad de adquirir un equipo para controles de calidad en Radioterapia, y posterior a un análisis riguroso de las características requeridas se optó por el contenedor modelo T41023³, mostrado en la Figura 6y descrito en el Anexo 1,cuyas paredes son de polimetilmetacrilato (PMMA), un material que, debido a su coeficiente de atenuación lineal de energía, simula adecuadamente las condiciones de la sangre en el cuerpo humano (PTW-Freiburg, 2009).

Figura 6

Contenedor modelo T41023 utilizado para realizar controles de calidad en Radioterapia



Fuente: PTW-Freiburg. (2009).

³Marca PTW, con paredes de 1 cm de acrílico (PMMA) y dimensiones de 300 mm x 300 mm x 300 mm.

Este contenedor no fue elaborado específicamente para irradiaciones de muestras de sangre, sino para realizar controles de calidad en Radioterapia, sin embargo, su diseño y la mayoría de sus componentes son aceptables también para esta finalidad, siempre y cuando posea los soportes adecuados para las muestras de sangre y se verifiquen los aspectos dosimétricos relevantes, entre ellos la dispersión generada, el kerma en aire y la dosis absorbida.

4. Marco Teórico

Las ondas electromagnéticas pueden ser clasificadas en radiaciones que no son ionizantes y radiaciones que sí lo son. En el libro “Introduction to radiological physics” (Herbert, F., 1986), Frank Herbert Attix define a las RI, como aquellas radiaciones con la capacidad de ionizar los átomos de la materia, arrancando sus electrones de valencia. Dado que la energía mínima necesaria para que un electrón abandone su átomo es alrededor de 25 eV (Herbert, F., 1986) se define como RI a toda radiación cuya energía sea igual o mayor a dicho valor. Actualmente las RI tienen una inmensa cantidad de aplicaciones: industria, energía, investigación, medicina, radiobiología, etc. (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2016a), siendo las aplicaciones en radiobiología el énfasis de esta investigación.

Con el paso de los años y del estudio de las RI, se han definido una gran cantidad de magnitudes dosimétricas (International Atomic Energy Agency, 2013) con las cuales cuantificar los efectos de las RI en la materia y los seres humanos. Entre las magnitudes más utilizadas se encuentran la exposición, el KERMA y la dosis absorbida (Herbert, F., 1986). Frank Herbert Attix, define cada una de ellas según se menciona a continuación.

Exposición (X): Se define como el cociente de toda la carga eléctrica liberada en un diferencial de masa de aire. Sus unidades son C/kg.

$$X = \frac{dQ}{dm}$$

Donde Q es la carga liberada en el diferencial de masa dm. Esta magnitud solamente está definida para ionizaciones en el aire.

KERMA (K): Es una magnitud definida para radiaciones indirectamente ionizantes, como lo son los fotones y neutrones. Su nombre proviene del acrónimo en inglés “Kinetic Energy Released in Matter” y se define como el valor esperado de la energía transferida a las partículas cargadas, por unidad de masa. Sus unidades son J/kg

$$K = \frac{dE_{tr}}{dm}$$

Donde: E_{tr} es la energía transferida por medio de la radiación en cierto volumen de interés dV , el cual contiene al diferencial de masa dm .

Dado que el kerma para fotones consiste de la energía transferida hacia los electrones y positrones por unidad de masa del medio, la energía cinética que adquieren estas partículas cargadas puede gastarse posteriormente mediante dos mecanismos:

a. Colisionando con el campo de fuerzas de otros electrones del medio, y por lo tanto, produciendo una cadena de sucesos de ionización y excitación en las zonas cercanas a su trayectoria.

b. Interaccionando con el campo de fuerzas de Coulomb de los núcleos atómicos, el cual desacelera las partículas y produce radiación de Bremsstrahlung (Haug, E. & Nakel, W., 2004), generando una pérdida parcial de la energía de la radiación en forma de fotones, denominada “pérdida radiativa”.

Entonces, como la energía del kerma puede gastarse de estas dos maneras, típicamente se habla del kerma total como la suma de *kerma de colisión* y *kerma radiativo*, es decir:

$$K = K_c + K_r$$

Donde K_c es el kerma de colisión y K_r es el kerma de las pérdidas radiativas.

Dosis absorbida (D): Este término aplica para todos los tipos de radiación ionizante y se define como la energía impartida por la RI a la materia. Sus unidades equivalen a son J/kg, aunque normalmente se utiliza en Gy (1 J/kg = 1 Gy).

$$D = \frac{dE}{dm}$$

Donde E es el valor esperado de la energía impartida en el volumen infinitesimal dV que contiene al diferencial de masa dm. Por lo cual, la dosis absorbida representa a la energía por unidad de masa que “queda” en el punto de interés y que posteriormente se absorbe.

Combinando el estudio de las radiaciones ionizantes por medio de los conceptos de la Física y la Biología, se ha desarrollado el campo llamado *radiobiología*: una mezcla de ambas disciplinas que estudia los efectos de la radiación en tejidos y organismos vivos (International Atomic Energy Agency, 2005).

Gracias al extenso desarrollo de la radiobiología, se conocen varias técnicas para estimar la dosis absorbida en el organismo de una persona irradiada, donde la mayoría de

éstas son realizadas mediante biomarcadores en los tejidos, es decir, análisis de laboratorio enfocados en determinar algún efecto biológico producido, debido a la dosis absorbida en ellos. Algunas de las técnicas permiten elaborar curvas de efecto biológico en función de la dosis absorbida en personas sanas, utilizando muestras de sangre que han sido irradiadas adrede con dosis conocidas. Estos resultados se toman como modelo o curva de calibración y posteriormente ayudan a estimar con gran precisión una dosis desconocida en personas irradiadas.

Las técnicas de análisis para los biomarcadores pueden variar en precisión, sencillez, cantidad de muestras necesarias, correlación en los efectos radioinducidos, el costo monetario del procedimiento y muchos otros aspectos, pero en general, la técnica aplicada idealmente debería cumplir con las siguientes condiciones (Boada, A., Mandina, T., González, J., Romero, I. y García, O., 2011):

- Relación dosis-efecto que perdure en el tiempo
- Una alta especificidad respecto a las radiaciones
- Fácilmente reproducible
- Cubrir un amplio intervalo de dosis
- Indiferente ante irradiación externa o interna
- Fácil recolección de la muestra
- Rápidos resultados

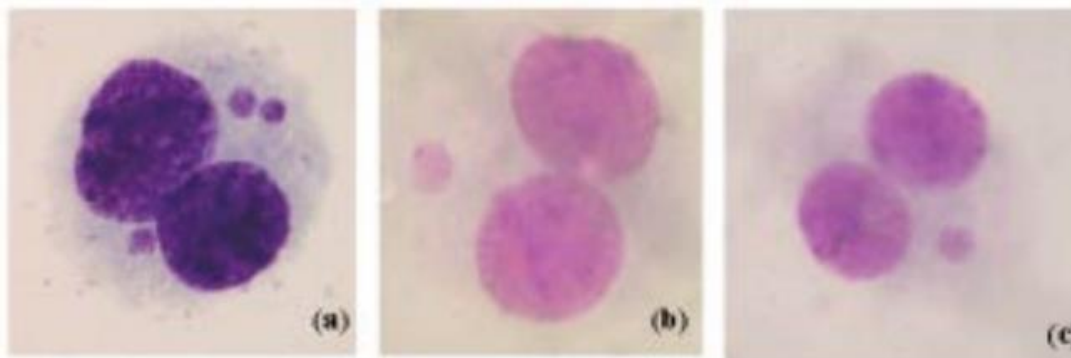
Debido a estas consideraciones, actualmente gran parte de la generación de curvas de efecto biológico en función de la dosis se realizan observando daños (lesiones) producidos en las células, específicamente en linfocitos. Se conocen varios biomarcadores que cumplen con estas consideraciones, entre ellos la cuantificación de cromosomas dicéntricos, los cuales son cromosomas estructuralmente anormales por poseer dos centrómeros. Esta técnica es muy precisa pero conlleva una población estadística muy alta.

Otro biomarcador importante es la presencia de micronúcleos (MN). Los MN son núcleos celulares cuyo tamaño es mucho menor al núcleo principal (NP). Su formación se da principalmente cuando, después de anomalías en la división celular, algunos fragmentos de cromosomas acéntricos que no fueron incluidos en el NP son envueltos por una membrana celular, quedando excluidos del NP pero manteniendo una morfología similar a este (Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H.,

Eastmond, D. A., Tucker, J. D., & Thomas, P., 2011). La Figura 7 muestra algunas células portadoras de MN, los cuales son fácilmente reconocibles ante el microscopio óptico (Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L. y Patiño, A., 2005).

Figura 7

Células binucleadas con micronúcleos vistos al microscopio óptico



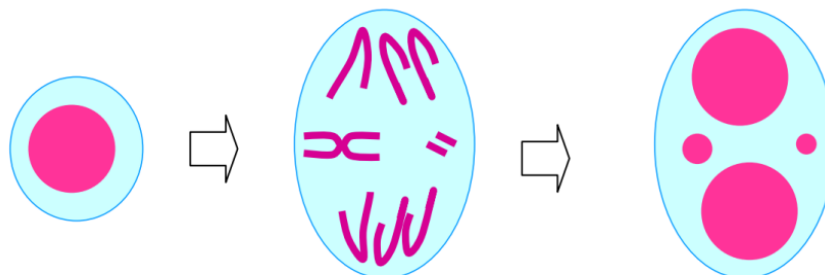
Fuente: Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L. y Patiño, A. (2005)

Actualmente se sabe que los MN no solo se originan de fragmentos de cromosomas acéntricos, sino también de fragmentos de cromátides acéntricas o incluso de cromosomas enteros que no se incluyeron en los núcleos hijos durante la finalización de la telofase, porque no se fijaron correctamente con el huso durante el proceso segregación en anafase (Fenech, M. et al, 2011), por lo cual, podríamos definir en palabras simples, que los MN son formaciones extra-nucleares que contienen fragmentos de cromosomas, o cromosomas enteros, que no se incorporaron en el núcleo de la célula hija después de la división celular.

La Figura 8 muestra un esquema básico de la formación de MN durante la mitosis.

Figura 8

Formación de MN durante la mitosis a partir de fragmentos de cromosomas que no fueron incluidos en los NP después de la telofase.

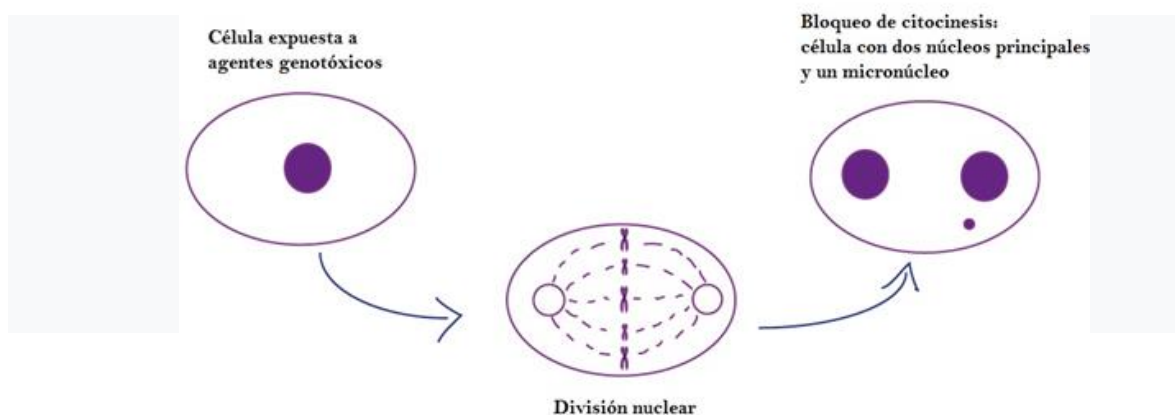


Fuente: Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D., & Thomas, P. (2011)

En general, la formación de MN también puede inducirse por exposición a agentes genotóxicos, como se muestra en la Figura 9, aunque también existe cierta cantidad “natural” en los individuos, generados a partir de errores espontáneos en la segregación de cromosomas o cromátides durante la mitosis. Cuando se hace referencia a los MN que están presentes en las células sin la acción previa de algún agente genotóxico externo, se le llama “cantidad basal de MN”. En promedio, una persona sana puede tener entre 5 y 20 MN por cada 1000 células (Fenech, M. et al, 2011), mientras que la cantidad de MN producidos por agentes genotóxicos externos será proporcional a la acción de dicho agente, aumentando conforme al tiempo de exposición y toxicidad del agente, como es el caso de la exposición a las radiaciones ionizantes.

Figura 9

Formación de MN a partir de la exposición a agentes genotóxicos.



Fuente: Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D., & Thomas, P. (2011)

Como fue propuesto por Countryman y Heddle en 1976 (Countryman, P. y Heddle, J., 1976), el incremento en la formación de micronúcleos es una medida de la inestabilidad genética, y la dosimetría citogenética, mediante el conteo de MN, analiza la aparición de estos biomarcadores cuando se absorben dosis de varios Gray (Gy). La frecuencia de aparición de los MN aumenta con la dosis, por lo que diversos organismos internacionales han recomendado utilizar una curva que correlaciona al efecto biológico con el cuadrado de la dosis absorbida, sumado a una contribución lineal con la dosis. Este modelo es llamado Modelo Lineal-Cuadrático (MLQ) (Joiner, M. & Van der Kogel, A., 2009).

Durante la división celular, el material genético contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente, generando dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a roturas cromosómicas y al efecto de la radiación (Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L. y Patiño, A., 2005). Como las fuentes radiactivas emiten rayos gamma, estas son utilizadas en una gran cantidad de industrias para medir densidad de materiales, espesores, realizar radiografías de las estructuras, mejoramiento de los cultivos o esterilización (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2018). Además, muchos de los tratamientos médicos en radioterapia son llevados a cabo mediante rayos gamma⁴ de Co60, y otros tratamientos son llevados a cabo en medicina nuclear mediante I¹³¹ (Volterrani, D., Erba, P., Carrio, I., Strauss, H. & Mariani. (Eds), 2019). Dadas las razones anteriores, es necesario contar con curvas de efecto biológico en función de la dosis para este tipo de radiación, y de esta manera estimar la dosis absorbida, para consecuentemente tomar las decisiones clínicas adecuadas en los casos donde exista la posibilidad de aparición de efectos biológicos radioinducidos como quemaduras, cataratas, pérdida de cabello o algún tipo de cáncer (Beyzadeoglu, M., Ozyigit, G. & Cüneyt, E., 2010).

Cuando la radiación deposita gran cantidad de energía en los tejidos, se producen rupturas en las cadenas o hebras del ácido desoxirribonucleico (ADN). Las células sanas poseen la capacidad de reparación ante la mayoría de los acontecimientos en el ADN, pero algunos de los efectos no son posibles de revertir. Como se mencionó anteriormente, el modelo radiobiológico aceptado y utilizado actualmente a nivel mundial es llamado “Modelo Lineal-Cuadrático”, o simplemente MLQ. Este modelo teórico parte de comparar la fracción de supervivencia celular S en función de la dosis absorbida D , y presupone que el daño en

⁴ El Co⁶⁰ decae mediante desintegración beta en Ni⁶⁰, luego el núcleo de Ni⁶⁰ emite rayos gamma de 1,17 MeV y 1,33 MeV.

la célula puede ser reparable o irreparable (Joiner, M. & Van der Kogel, A., 2009). El MLQ se expresa mediante la ecuación:

$$S(D) = e^{-(\alpha D + \beta D^2)} \quad (1)$$

Donde:

S es la fracción de supervivencia celular

D es la dosis absorbida en Gy

α está relacionado con el daño que no es posible reparar a una dosis D (daño letal) y sus unidades son Gy^{-1}

β está relacionado con la capacidad para reparar el daño sub letal y sus unidades son Gy^{-2}

La principal ventaja del MLQ radica en el hecho de que es matemáticamente simple, fácil de usar y que los coeficientes α y β se hallan empíricamente para cada tejido. Diversos autores han correlacionado la fracción de supervivencia celular con algún efecto biológico producido por la radiación (Joiner, M. & Van der Kogel, A., 2009). En este sentido, asignando a la variable Y la frecuencia de MN producidos, y realizando el cambio de variable $Y = -\ln S$, la ecuación (1) se expresa según:

$$Y(D) = \alpha D + \beta D^2 \quad (2)$$

Es conocido, además, que un individuo sano posee naturalmente una cantidad basal de MN (Zalacain, M., Sierrasesúмага, L. y Patiño, A., 2005). Se define así una constante C como la frecuencia basal de los MN en un individuo sano, es decir, la fracción de MN hallados en las CBN analizadas. Esta frecuencia basal es influenciada por factores como la edad, exposición crónica a agentes tóxicos, consumo de tabaco, alcohol u otras drogas (Fenech, M., et al, 2011). Dichas variables deben tomarse en cuenta para que al elegir los voluntarios que donarán las muestras de sangre, estas sean personas con hábitos saludables. Tomando en cuenta la constante C, la ecuación general de dosis-respuesta se da mediante la expresión:

$$Y(D) = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (3)$$

Donde:

Y (D) es la frecuencia observada de MN

C es la frecuencia basal de MN para cada individuo

D es la dosis absorbida en Gy

α es el coeficiente asociado con el daño letal $[\alpha] = Gy^{-1}$

β es el coeficiente asociado con la reparación del daño sub letal $[\beta] = Gy^{-2}$

Los coeficientes α y β también están relacionados con la transferencia lineal de energía (TLE) de la radiación. La TLE es definida como la cantidad de energía que deposita la radiación en la materia, por unidad de longitud (Herbert, F., 1986). La TLE es específica para cada tipo de radiación, y en el caso de rayos gamma, será determinada por la energía depositada en la materia mediante los electrones secundarios generados por dichos fotones.

En la expresión (3), se observa que para los casos donde el coeficiente β tiende a cero, el resultado es una ecuación lineal (pues este término perdería importancia biológica y quedaría “enmascarado” estadísticamente). Este tratamiento sería adecuado cuando la TLE es alta, como lo es para neutrones de fisión y partículas alfa (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014), mientras que en el caso de rayos gamma (donde la TLE es baja), el ajuste toma en cuenta ambos coeficientes, resultando en una ecuación cuadrática. Sin embargo, para TLE baja, se podría utilizar una función lineal en el caso de que la curva encontrada no posea una correlación adecuada para una función cuadrática, y como los métodos de ajuste de la curva se basan en modelos estadísticos de Poisson, también se debe verificar que la distribución de MN se ajusta a dicha distribución para cada punto de dosis absorbida utilizado (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014).

Para realizar un conteo adecuado de los micronúcleos producidos en las células, y que la correlación con la cantidad de radiación absorbida en la sangre sea efectiva, es sumamente importante conocer y mantener las condiciones de irradiación, por lo cual será necesario contar con un “maniquí” (International Atomic Energy Agency, 2005) para colocar las muestras que simule adecuadamente las condiciones de la sangre mientras fluye en el organismo de una persona. Entre las características más importantes a considerar se encuentran la atenuación lineal de la energía, el coeficiente másico de absorción (Herbert, F., 1986) y la densidad promedio del cuerpo humano, pues de esta manera la interacción de la radiación con las partículas del medio será similar en ambos entornos (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014). Uno de los materiales más utilizados para esta finalidad es el polimetilmetacrilato (PMMA) (National Institute of Standards and Technology, 2018), el cual posee una densidad de 1180 kg/m^3 y un coeficiente de atenuación

lineal de energía para fotones de 1,25 MeV (el promedio de las emisiones del Co^{60}) equivalente a $7,31 \times 10^{-2} \text{cm}^{-1}$ (National Institute of Standards and Technology, 2019a), estos valores son muy cercanos al valor para el agua –componente más importante de la sangre y del cuerpo humano–, los cuales son 1000kg/m^3 y $6,32 \times 10^{-2} \text{cm}^{-1}$, respetivamente (National Institute of Standards and Technology, 2019b).

El maniquí también debe poseer un espesor suficiente para asegurar el equilibrio de partículas cargadas (CPE, por sus siglas en inglés) y de esta forma corroborar la dosimetría de cada punto de dosis absorbida. Debe ser así pues las cámaras de ionización utilizadas para la dosimetría de los campos en realidad miden el kerma de colisión (K_c), y como fue descrito por Herbert Attix (Herbert, F., 1986), en condiciones de CPE, el K_c es idéntico a la dosis absorbida, es decir $D \stackrel{CPE}{\cong} K_c$.

Para llevar a cabo la irradiación, esta debe realizarse a una distancia suficientemente larga de la fuente para asegurar que sea homogénea en todo el tubo de ensayo que contiene la muestra de sangre periférica (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014). Además, es necesario conocer a cabalidad la tasa de dosis y energía media de la fuente, pues es importante que los tiempos de irradiación para cada muestra sean similares.

Posterior a la irradiación de las muestras, estas son trasladadas al laboratorio donde comenzará el proceso de siembra y cosecha celular para el conteo de MN. Para este fin, es recomendado utilizar la prueba de MN con bloqueo de la citocinesis (CBMN) (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014). La técnica de bloqueo de citocinesis se introdujo a mediados de 1980 (Fenech, M. & Morley, A., 1986) utilizando el compuesto llamado citocalasina-B, el cual tiene origen fúngico y posee la propiedad de inhibir la citocinesis en las células de mamíferos (Scherlach, K., Boettger, D., Remmea, N. & Hertweck, Ch., 2010) y de esta manera, realizar el conteo de los MN en células multinucleadas que han sufrido una sola división, el cual es uno de los criterios para la selección de los MN.

La elección de las células viables, así como el conteo de los MN, se realizan mediante varios criterios (Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L. y Patiño, A., 2005). Estos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1*Criterios de selección para células binucleadas y MN en cultivos celulares.*

Criterios para células binucleadas	Criterios para MN
El citoplasma debe distinguirse claramente	El diámetro oscila entre 1/16-1/3 de la media del diámetro del núcleo principal
Membranas citoplasmática y nuclear intactas	No refractarios
Igual tamaño, forma y patrón de tinción	Intensidad de tinción similar a los núcleos principales
Pueden estar unidos por puentes nucleoplásmicos	Forma similar a los núcleos de la célula
Pueden tocarse pero no solaparse	No conectados con ninguno de los núcleos de la célula
Ninguno de los núcleos debe encontrarse en etapas de apoptosis	Pueden tocar los núcleos de la célula pero no solaparse con ellos

Fuente: Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L. y Patiño, A. (2005)

Al cumplirse todos los criterios enumerados en la Tabla 1, se procede a realizar el conteo de los MN.

El análisis de los linfocitos para el conteo de los MN debe incluir como mínimo 1000 células binucleadas (de dos cultivos de 500 células c/u) para cada punto de dosis absorbida, y realizar el conteo de los MN en éstas (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014). En el caso de curvas donde la cantidad de muestras sea relativamente pequeña, será necesario realizar la Prueba T o Prueba U y así determinar si la diferencia entre dos recuentos de Poisson es significativa (Fisher, J., 1987), comparándose las medias con el fin de determinar si los dos conjuntos de datos proceden de la misma población.

5. Metodología

A continuación, se enumeran las principales etapas para cumplir con los objetivos de la investigación.

5.1. Construcción del soporte para las muestras de sangre

Con la colaboración del Laboratorio Técnico de Mecánica de Precisión de la Escuela de Física de la UCR (Universidad de Costa Rica, 2020), se construyó e incorporó un soporte de poliestireno (Comisión Europea y Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas, 2003) con dimensiones de largo: 22,0 cm; diámetro externo: 2,25 cm; diámetro interno: 1,90 cm, el cual pudiese colocarse en el centro de irradiación del maniquí de agua para albergarlos tubos de ensayo con las muestras de sangre, de tal forma que se mantengan verticales y centrados con respecto al isocentro del gantry. La Figura 10 muestra parte del proceso de elaboración del soporte, mientras que la Figura 11 muestra un tubo de ensayo que contiene sangre para irradiar, dentro de este soporte.

Figura 10

Elaboración del soporte para colocar las muestras de sangre en el maniquí.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

Figura 11

Soporte de poliestireno conteniendo una muestra de sangre dentro de un tubo de ensayo.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

5.2 Aprobación de cursos y talleres

Para llevar a cabo las irradiaciones, primero se aprobó el curso de Buenas Prácticas Clínicas impartido en la UCR, con el cual se conocieron los aspectos más importantes a la hora de trabajar con personas o muestras biológicas proveniente de las mismas, así como la importancia de llevar a cabo investigaciones que representen un beneficio para la humanidad. Asimismo, se llevó a cabo y se aprobó el taller “Técnicas cito-moleculares aplicadas a la toxicología genética”, impartido en el INISA de la UCR, con el cual se aprendieron las técnicas de laboratorio que posteriormente se utilizarán para la siembra y cosecha de los linfocitos.

5.3 Permisos de uso del equipo e instalaciones

Se tramitaron los permisos con el Dr. Pablo Ordóñez, Director del Servicio Radioterapia del Servicio de Radioterapia del Hospital San Juan de Dios (Caja Costarricense del Seguro Social, 2020), para utilizar la fuente de Co-60, así como de mantener el maniquí de agua dentro de las instalaciones de radioterapia en el periodo de realización de las irradiaciones (alrededor de 4 meses). Durante la permanencia en las instalaciones y todas las irradiaciones realizadas, se contó con la asesoría del Físico-Médico Marvin Rodríguez, quien siempre se mostró atento a colaborar con el proyecto.

Con el apoyo de la Lic. Luisa Valle Bourrouet, se tramitaron los permisos para permanecer y utilizar los laboratorios e insumos del INISA, entre ellos el Laboratorio de Citogenética y el Laboratorio de Microscopía.

5.4 Donantes de sangre

Para la realización de la curva de efecto biológico se utilizaron dos donantes sanos, los cuales, según las recomendaciones del OIEA (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014), cumplían con los siguientes requisitos: rango de edad similar, un donante masculino y uno femenino, no fumadores, no consumidores de alcohol, sin presencia de neoplasias o enfermedades en los linfocitos, no expuestos a fármacos o químicos ambientales en altas concentraciones. Ambos donantes fueron notificados del alcance del proyecto y ambos firmaron el consentimiento informado donde se indica que los datos de serán utilizados solamente como reactivo, pero que los efectos producidos en la sangre no afectarán física, química, biológica ni emocionalmente a ninguno de los individuos. El consentimiento informado se observa en el Anexo 2.

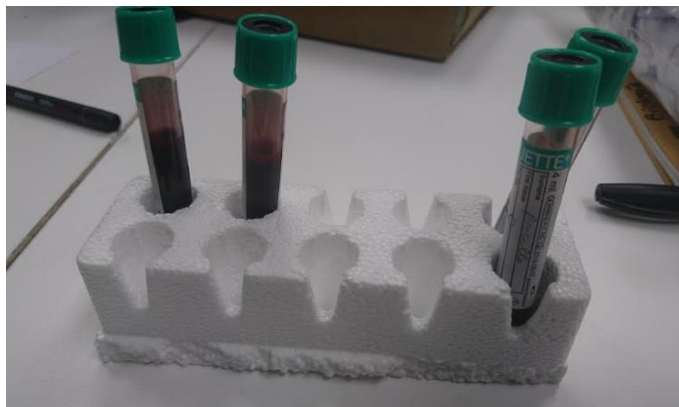
5.5 Toma, colocación y transporte de las muestras de sangre

La venopunción fue realizada en las instalaciones del INISA por un colaborador del INISA, alrededor de dos horas antes de su respectiva irradiación. Las muestras de sangre se colocaron en tubos de ensayo convencionales tipo Vacutaner™, los cuales eran llenados

alrededor de un 60% de su capacidad, según se muestra en la Figura 12. Posteriormente fueron llevadas al Hospital San Juan de Dios para ser irradiadas.

Figura 12

Muestras de sangre que será irradiada en tubos Vacutaner™



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

Previo a la irradiación, cada muestra se colocó verticalmente adentro del soporte de acrílico, el cual a su vez se colocó en el inserto del maniquí, según se muestra en la Figura 13.

Figura 13

Soporte que contiene la muestra de sangre, dentro del maniquí de agua.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

5.6 Condiciones de irradiación

Previo a la irradiación de las muestras de sangre para la elaboración de la curva de efecto biológico, se realizaron los análisis y cálculos para determinar las condiciones de irradiación del maniquí. El equipo utilizado para irradiar fue el Theratron-80, mostrado en la Figura 14, el cual posee una fuente radiactiva de Co-60, misma que es aprovechada para irradiar pacientes y diversos tipos de materiales.

Figura 14

Equipo emisor de rayos gamma Theratron-80, utilizado para realizar las irradiaciones.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

El proceso de dosimetría se llevó a cabo utilizando una cámara de ionización sumergible tipo Farmer, modelo 217467008, mostrada en la Figura 15, la cual se colocó en la misma posición donde posteriormente irían los tubos de ensayo con las muestras de sangre, es decir, adentro del soporte de acrílico.

Figura 15

Cámara de ionización sumergible tipo Farmer utilizada para realizar la dosimetría en el maniquí de agua.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

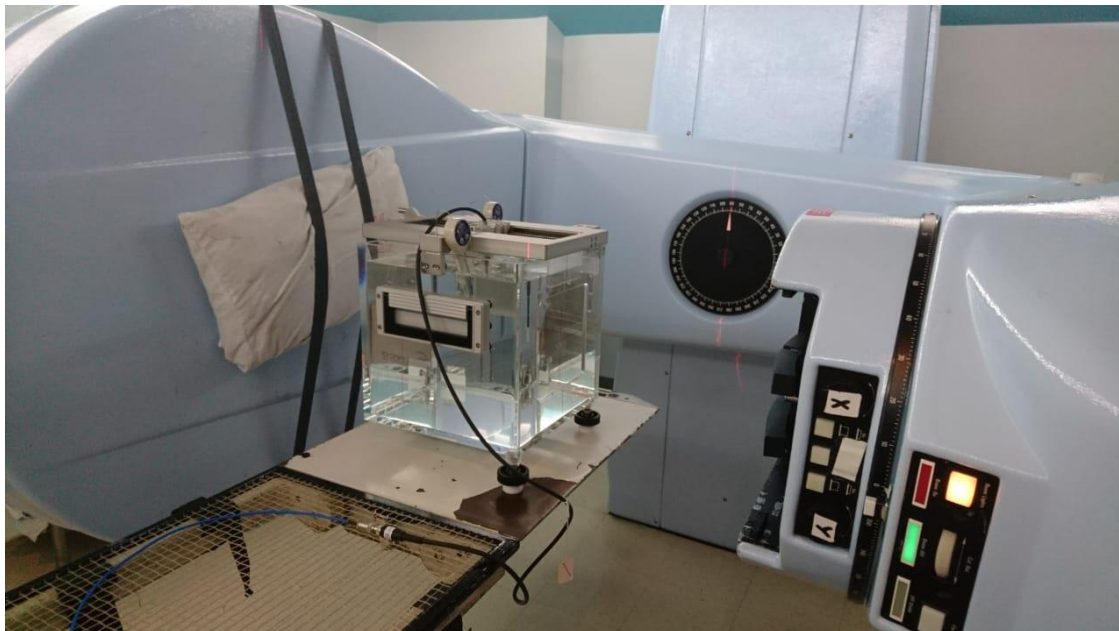
La adquisición de los datos se llevó a cabo utilizando un electrómetro con una diferencia de potencial de 300 V y un factor de calibración F_c de $5,135 \times 10^7 \text{ Gy/C}$. En cada irradiación se midió la temperatura del agua y la presión atmosférica para realizar las respectivas correcciones, es decir, el factor F_{TP} (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2005).

5.6.1 Condiciones de irradiación propias del equipo de teleterapia

El equipo Theratron-80, al igual que todos los equipos emisores de RI para teleterapia, cuenta con una camilla donde se colocó el maniquí de agua que contenía las muestras de sangre, y un cabezal conocido como gantry, el cual puede girar 360° para irradiar hacia un isocentro, según se muestra en la Figura 16.

Figura 16

Maniquí de agua posicionado en la camilla del equipo Theratron-80. El gantry se encuentra ubicado a 90°, con una distancia de la fuente a la superficie (SSD) de 80 cm.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

Durante la irradiación de cada muestra, para el posicionamiento del equipo emisor se definieron los siguientes parámetros:

- Tasa de dosis absorbida: entre 140 cGy/min (primera irradiación, 10 de diciembre de 2018) y 133 cGy/min (última irradiación, 7 de mayo de 2019)
- Tamaño de campo: 10 cm x 10 cm
- Cantidad de haces: dos haces laterales opuestos con igual peso. Uno a 90° y el otro a 270°
- Distancia de la fuente a la superficie (SSD): 80 cm

5.6.2 Condiciones de irradiación para el maniquí de agua

5.6.2.1 Llenado de agua

El maniquí de agua debe llenarse encima de la camilla de irradiación, entre un 80% y 90% de su capacidad, es decir, entre 2 y 4 cm por encima de la línea superior de la ventana de irradiación.

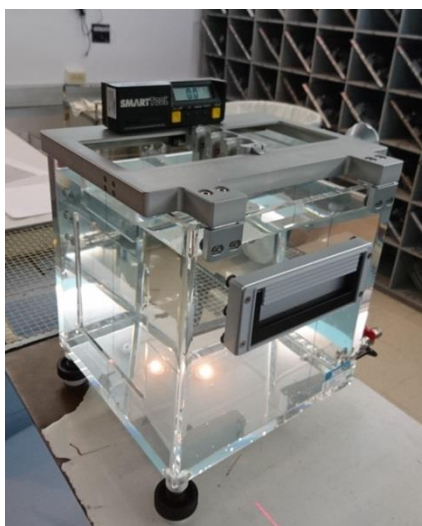
Pese a que la absorción de agua por parte de las paredes del recipiente es muy leve, cada vez que este se utilice, debe secarse completamente y esperarse al menos 12 horas para volver a utilizarlo. Después de su uso, el maniquí debe almacenarse en un lugar seco.

5.6.2.2 Colocación sobre la camilla de irradiación

El maniquí de agua debe nivelarse con respecto a la superficie de la camilla. Para este efecto se giran las bases de sus soportes en contacto con la camilla según sea necesario. Para verificar que se encuentra bien nivelado, se utiliza un nivel digital marca SmartTool, mostrado en la Figura 17, el cual presenta una tolerancia de $\pm 0,1^\circ$.

Figura 17

Maniquí de agua nivelado con respecto a la superficie horizontal de la camilla. Se observa un ángulo de inclinación de cero grados.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

Después de nivelar el maniquí, este debe rotarse de tal manera que los rayos láser de la sala de tratamiento se alineen con respecto a los márgenes propios del maniquí de agua, asegurando que la cámara de ionización (la cual previamente se colocó dentro del mismo soporte que tendrá las muestras de sangre), se ubique en la intersección de los haces, como se puede apreciar en la Figura 18.

Figura 18

Alineación del maniquí de agua con los rayos láser de la sala de tratamiento. La cámara de ionización se ubica dentro del soporte de irradiación, el cual a su vez se ubica en la intersección de los rayos láser.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

5.6.2.3 Condiciones dosimétricas

a. Equilibrio de partículas cargadas.

Según se recomienda en el manual del OIEA (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014), el maniquí de agua debe poseer un espesor suficiente para asegurar el equilibrio de partículas cargadas (CPE) (Herbert, F., 1986). Para rayos gamma de Co^{60} , el CPE se asegura con un material que sea equivalente a 4 mm de agua. Este requisito se logra inequívocamente, ya que el maniquí posee dimensiones de 30 cm x 30 cm x 30 cm, y este volumen se llena completamente con agua.

b. Irradiación uniforme de las muestras de sangre.

Para que la irradiación de la sangre se considere homogénea, la dosis absorbida de la parte trasera y delantera de la muestra de sangre no debe tener más de un 2% de discrepancia (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014). Como los tubos de ensayo poseen 1,3 cm de ancho, la muestra se debería situar mínimo a 1 metro de distancia de la fuente, sin embargo, el equipo Theratron-80 no logra alcanzar esta SSD, por lo que en lugar de realizar las irradiaciones con un solo haz, se decide realizar dos haces en cada irradiación: un haz lateral a 90° y otro a 270°.

Dado que ambos haces poseen la misma intensidad (cada uno dará la mitad de la dosis absorbida prescrita) pero se aplicarán en direcciones opuestas, la irradiación de las muestras será uniforme.

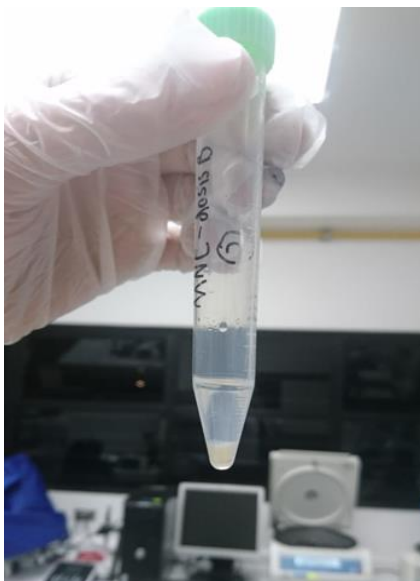
5.7 Siembra y cosecha celular

Para realizar la siembra y cosecha celular, se irradió un tubo con sangre de una donante femenina y otro con sangre de un donante masculino (ambos con su consentimiento informado y firmado), para cada uno de los puntos de dosis. Posterior a la irradiación de cada muestra, se mantuvieron en un baño maría a 37 °C por un periodo de dos horas, lo cual es necesario para permitir que ocurran todas las reparaciones celulares posibles en el tejido sanguíneo (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014). Al transcurrir las dos horas, las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Citogenética del INISA donde comenzaría el proceso de siembra y cosecha celular. Este proceso es necesario para analizar el daño biológico inducido en los linfocitos debido a la radiación de los rayos gamma. El protocolo de siembra y cosecha celular se especifica en el Anexo 3 y tiene como finalidad poder separar los linfocitos de los demás componentes de la sangre, así como hacer más sencilla la observación de los MN en ellos.

La Figura 19 muestra un tubo cónico de 15 mL que contiene la suspensión de células binucleadas de linfocitos de sangre periférica, listos para preparar las extensiones celulares en los portaobjetos.

Figura 19

Muestra de linfocitos después de varios procesos de centrifugado y separación.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

El proceso de cosecha celular culmina cuando las muestras de linfocitos son colocadas (goteadas) en láminas de vidrio (portaobjetos) para su observación con el uso de un microscopio. La Figura 20 muestra un portaobjetos que contiene linfocitos para ser analizados con el microscopio.

Figura 20

Portaobjetos con linfocitos para analizar con el uso de microscopio óptico.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

5.8 Análisis de células binucleadas de linfocitos mediante microscopio óptico

Después de que los linfocitos son goteados en los portaobjetos, se procede a analizarlos con el uso del microscopio óptico mostrado en la Figura 21.

Figura 21

Microscopio óptico utilizado para el análisis de las células binucleadas y los MN.

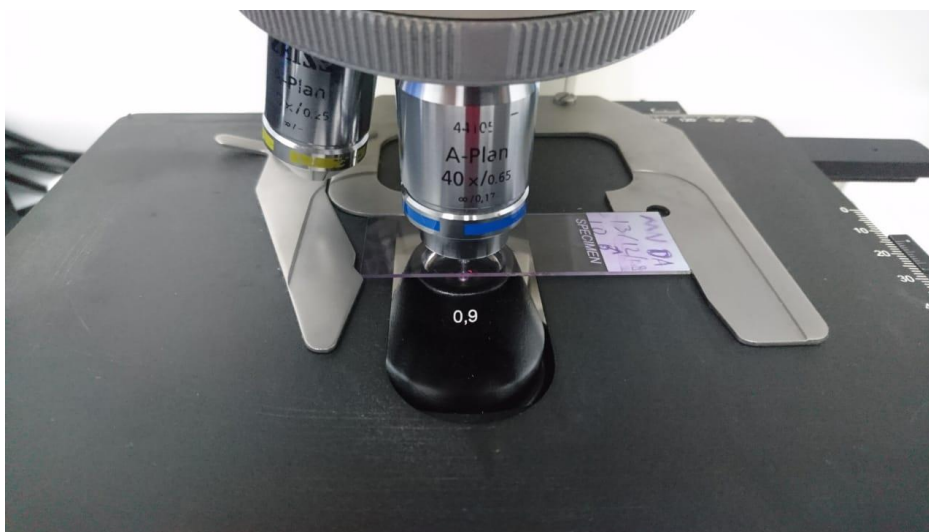


Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

El aumento utilizado para observar las células binucleadas y los MN presentes en ellas fue de cuarenta veces su tamaño real, es decir, 40x, aunque en ocasiones, cuando las células no se observaban con suficiente calidad, se utilizaba un ocular con aumento de 100x para cerciorarse de que cumplían con los criterios de selección de MN. La Figura 22 muestra el microscopio utilizado, enfocando con un ocular de 40x.

Figura 22

Ocular con aumento de 40x para observación de las CBN y conteo de los MN.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

Siguiendo la recomendación del Manual de Dosimetría Citogenética del OIEA (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014), en cada uno de los puntos de dosis absorbida menores a 1 Gy (0; 0,3 y 0,5 Gy) se realizó un conteo de 2000 CBN debido a que la frecuencia de aparición en ellas es muy pequeña (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014), mientras que en cada uno de los puntos de dosis mayores a 1 Gy (1; 1,5; 2; 2,5; 3 y 4 Gy) se realizó un conteo de 1000 CBN, obteniéndose una población estadística total de 12 000 CBN analizadas para cada género. La Tabla 2 resume el conteo de datos para la muestra masculina.

Tabla 2

Cantidad de células binucleadas analizadas para cada punto de dosis absorbida de la muestra masculina. Las dosis absorbidas de 0, 0,3 y 0,5 Gy necesitan un mayor conteo debido a que la frecuencia de aparición en ellas es muy pequeña.

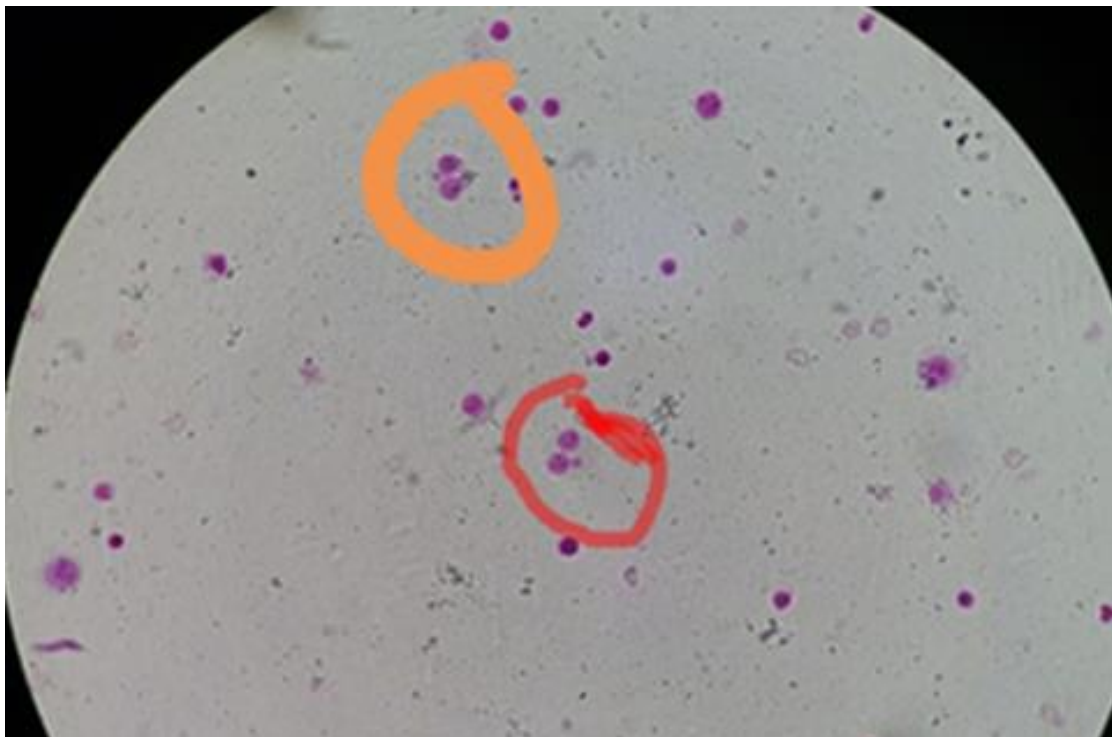
Dosis absorbida (Gy)	Cantidad de células binucleadas analizadas
0	2000
0,3	2000
0,5	2000
1	1000
1,5	1000
2	1000
2,5	1000
3	1000
4	1000

Fuente: Elaboración propia a partir de la investigación, 2020.

Para cada una de las 12000 CBN analizadas, se observaron los MN presentes y se llevó el conteo para calcular la frecuencia de aparición de MN por cada punto de dosis. La Figura 23 muestra un campo de visión del microscopio donde se observan varias metafases, y en algunas de ellas se observan MN.

Figura 23

Fotografía tomada desde un ocular con aumento de 40x donde se aprecian varias células binucleadas. En la CBN señalada en color naranja se observan dos MN, mientras que en la CBN señalada en rojo se aprecia 1 MN.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

Simultáneamente, se realizó el conteo de las muestras para el caso de estudio femenino. De igual manera, para cada una de las 12000 CBN analizadas, se observaron los MN presentes y se llevó el conteo para calcular la frecuencia de aparición de MN por cada punto de dosis.

Después de realizados ambos conteos en las muestras masculina y femenina, se combinaron los resultados en una sola población para llevar a cabo la realización de la curva con base en una mayor cantidad de datos.

6. Resultados

6.1 Resultado 1: Validación del maniquí de agua adquirido por el Instituto de Investigaciones en Salud.

Los resultados de las condiciones de irradiación se obtuvieron con base en las recomendaciones del OIEA, propuestas en el manual “*Dosimetría citogenética: Aplicaciones en materia de preparación y respuesta a las emergencias radiológicas*” del OIEA (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014)

6.1.1 Ubicación teórica del centro de irradiación del maniquí de agua.

En la sección 5.6 se especificó que el maniquí de agua posee una sola ventana de irradiación, es decir, la superficie sobre la cual se hará converger el haz de radiación; pero al surgir la necesidad de realizar dos haces opuestos para uniformizar la dosis absorbida, es necesario irradiar también a través de la cara opuesta a la ventana de irradiación.

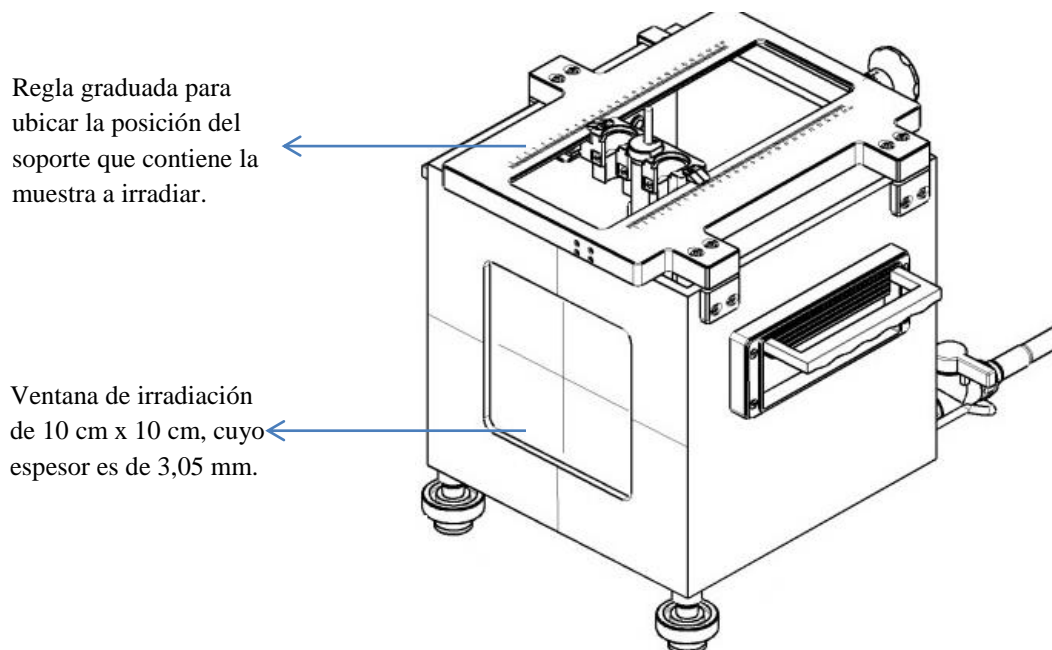
La ventana de irradiación posee un espesor de 3,05 mm, mientras que la cara opuesta posee un espesor de 10 mm; dado que los espesores son distintos, la radiación debe atravesar menos material en la ventana de irradiación que en la cara opuesta.

Si los espesores de las caras que atraviesa la radiación fuesen iguales, el centro de irradiación del maniquí estaría en el centro geométrico del mismo (a 14 cm del borde interno de cualquier cara), pero como los haces atravesarán espesores diferentes, para que la intensidad de radiación y la dosis absorbida mediante ambos haces sea la misma, el centro de irradiación debe ubicarse más cerca de la cara “gruesa”, y más lejos de la cara “delgada”, es decir, debe estar un poco más lejos de la ventana de irradiación.

La ubicación del soporte para colocar la muestra se logra fácilmente gracias a la regla graduada que posee el maniquí en su parte superior. La Figura 24 muestra un esquema del maniquí y la ventana de irradiación (PTW-Freiburg, 2009).

Figura 24

Esquema que muestra la ventana de irradiación del maniquí y la regla graduada para ubicar al soporte con la muestra para irradiar.



Fuente: (16 PTW-Freiburg, 2009).

A pesar de que el PMMA posee una densidad y composición atómica muy similar al agua, hay leves diferencias que deben considerarse, por lo cual, para ubicar el centro de irradiación es necesario calcular cuánta distancia recorrida por la radiación en PMMA se corresponde con la distancia recorrida en agua.

Para realizar el cálculo se utiliza el concepto de “coeficiente de atenuación lineal”, μ . El coeficiente de atenuación lineal da una medida de la reducción de la intensidad de un haz de radiación conforme este avanza cierta distancia en algún material (Herbert, F., 1986). Entre mayor sea el coeficiente de atenuación lineal de un material, más se atenuará la radiación conforme avanza en dicho material.

Según el NIST (National Institute of Standards and Technology) (National Institute of Standards and Technology, 2019a) para fotones de 1,25 MeV (promedio de los fotones del Co^{60}), el coeficiente de atenuación másico (μ/ρ) en PMMA equivale a $6,14 \times 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{g}$, mientras que para el agua equivale a $6,32 \times 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{g}$ (National Institute of Standards and Technology, 2019b). Dado que el coeficiente de atenuación lineal (μ) se obtiene

multiplicando el coeficiente de atenuación másico por la densidad del material (Herbert, F., 1986), fácilmente se puede hallar el coeficiente de atenuación lineal para ambos materiales.

La Tabla 3 resume los valores de densidad, coeficiente de atenuación másico y coeficiente de atenuación lineal para agua y PMMA a una energía de 1,25 MeV.

Tabla 3

Densidad y coeficientes de atenuación másicos y lineales para el agua y PMMA, con fotones cuya energía es 1,25 MeV. Para esta energía se observa que el coeficiente de atenuación lineal del PMMA es ligeramente mayor que el del agua.

Compuesto	Densidad (g/cm ³)	Coeficiente de atenuación másico (cm ² /g)	Coeficiente de atenuación lineal (cm ⁻¹)
Agua	1	6,32x10 ⁻²	6,32x10 ⁻²
PMMA	1,19	6,14x10 ⁻²	7,31x10 ⁻²

Fuente: Elaboración propia a partir de la investigación, 2020

Al dividir el coeficiente de atenuación lineal del PMMA entre el coeficiente de atenuación lineal del agua, se obtiene su proporción:

$$\frac{\mu_{PMMA}}{\mu_{agua}} = \frac{7,31 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}}{6,32 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}} = 1,16 \quad (4)$$

Dado que la ventana de irradiación posee 3,05 mm de espesor, pero la cara opuesta posee 1 cm (ambas caras en PMMA), se debe “completar” el espesor faltante en la ventana de irradiación. Es decir, a la ventana de irradiación le hace falta el equivalente a 1 cm – 0,305 cm = 0,695 cm para poseer el mismo espesor que la cara opuesta. Estos 0,695 cm serán aportados con el agua contenida en el maniquí.

Utilizando la ecuación (3), se obtiene:

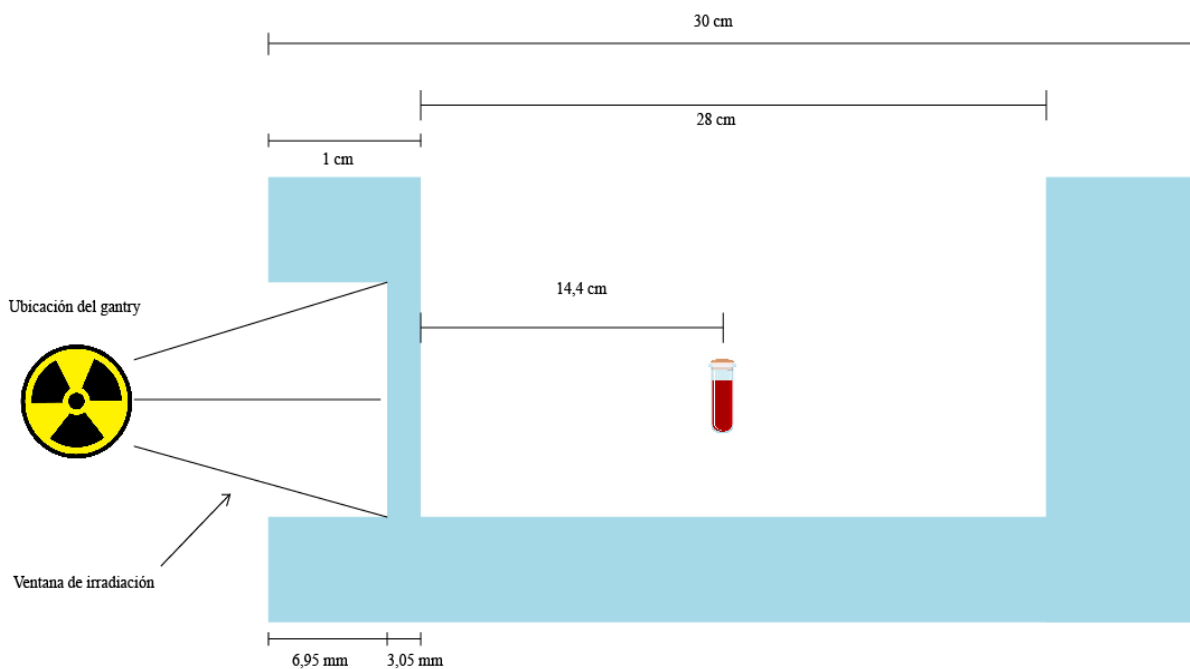
$$0,695 \text{ cm} \cdot 1,16 = 0,806 \text{ cm} \quad (5)$$

Por lo cual, la cantidad lineal de agua necesaria para cubrir el espesor faltante es de 0,806 cm.

Como la longitud interna del maniquí de agua es de 28 cm, al restar $28\text{ cm} - 0,806\text{ cm}$ se obtiene 27,2 cm. La mitad de este valor se corresponde con el centro de irradiación del maniquí, es decir, la posición en la cual debe colocarse la muestra de sangre para que la radiación atraviese cantidades equivalentes de material. Entonces, como la mitad de 27,2 cm es 13,6 cm, el centro de irradiación debe ubicarse a $13,6\text{ cm} + 0,806\text{ cm}$ de agua (equivalentes a 0,695 cm de PMMA), es decir, teóricamente el centro de irradiación debe colocarse a 14,4 cm del borde interno de la ventana de irradiación. La Figura 25 muestra un esquema con las dimensiones de una vista lateral del maniquí para explicar el cálculo realizado.

Figura 25

Esquema de las dimensiones laterales del maniquí de agua para obtener su centro de irradiación. El valor teórico obtenido para el centro de irradiación, es de 14,4 cm. La imagen no está a escala.



Fuente: Elaboración propia a partir de la investigación, 2020

6.1. 2 Ubicación experimental del centro de irradiación del maniquí.

Después de determinar teóricamente que la ubicación del centro de irradiación debería estar en la posición de 14,4 cm, se procedió a realizar algunas irradiaciones para corroborar que la dosis absorbida debida a cada haz fuese la misma.

Se realizaron 10 mediciones en cada haz, con dosis absorbidas que iban desde los 30 cGy hasta los 300 cGy, sin embargo, para las dosis absorbidas de 300 cGy, 250 cGy y 200 cGy se obtuvieron discrepancias un poco grandes, es decir, cercanas o mayores al 2% (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014), las cuales fueron: 1,5%, 2,2% y 2,4%, respectivamente.

Como estos valores fueron superiores al 2% recomendado, se decidió corregir empíricamente la posición del centro de irradiación, desplazándolo gradualmente desde el valor teórico (14,4 cm) hasta que la intensidad de cada haz fuese lo más parecida posible. Para tal efecto se midió la carga eléctrica liberada en cada uno de los haces, para 7 valores distintos de dosis prescrita (dosis entregada por la fuente).

Específicamente, se utilizaron dosis absorbidas prescritas de 30, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 cGy, pues son parte de los puntos de dosis absorbida a irradiar para realizar la curva de efecto biológico. Para cada uno de los puntos de dosis absorbida, se irradiaron 10 haces con el gantry a 90° y 10 haces con el gantry a 270°. Posteriormente, se calculó el promedio de la carga eléctrica liberada por cada haz en cada punto de dosis absorbida, y a partir del promedio, se calculó la discrepancia entre haces opuestos. Después de varias correcciones, se determinó que el punto que optimizaba las mediciones se ubicaba a 14,55 cm. En la Tabla 4 se resumen los resultados para esta posición.

Tabla 4

Lectura promedio de la carga eléctrica liberada para cada haz en cada dosis absorbida prescrita.

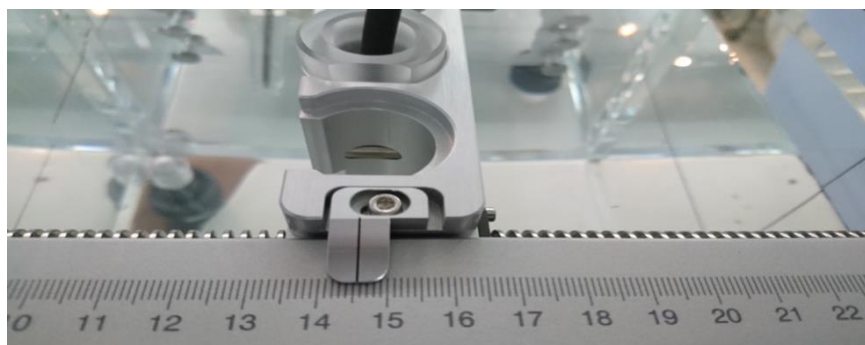
Dosis absorbida prescrita (cGy)	Lectura promedio de la carga eléctrica liberada en el haz a 90° (nC)	Lectura promedio de la carga eléctrica liberada en el haz a 270° (nC)	Discrepancia entre haces (%)
30	2,5653	2,5745	0,36
50	4,2649	4,2831	0,43
100	8,5160	8,5570	0,48
150	12,7645	12,8264	0,48
200	17,0133	17,0958	0,48
250	21,3527	21,4552	0,48
300	25,5876	25,7336	0,57

Fuente: Elaboración propia a partir de la investigación, 2020

Todas las discrepancias entre haces opuestos para cada dosis absorbida prescrita, mostraron valores inferiores al 2%, por lo cual, se detectó que la posición que optimiza la igualdad en la intensidad de los haces es de 14,55 cm, es decir, 1,5 mm de diferencia con respecto al valor hallado teóricamente. En la Figura 26 se muestra la ubicación correcta del soporte para realizar las irradiaciones.

Figura 26

Ubicación del soporte que contiene la muestra para irradiar. Se determina que la posición del centro de irradiación se ubica a 14,55 cm.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

6.1.3 Determinación de la dosis absorbida.

Para determinar que la dosis absorbida en el punto de interés fuese la misma dosis absorbida prescrita (dosis absorbida entregada por el equipo), se utilizaron los valores de carga liberada obtenidos en la Tabla 4 y se realizaron las correcciones por presión y temperatura (K_{TP}) (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2005), así como el factor de calibración de la cámara (F_c), según la ecuación:

$$D(Gy) = Q * K_{TP} * F_c$$

Donde el valor F_c es dado por la cámara de ionización y vale 51350000 cGy/C. El factor K_{TP} se calculaba para cada medición, según la ecuación:

$$K_{TP} = \frac{(273,15 + T)}{273,15} * \frac{1,01 \times 10^5 Pa}{P}$$

En esta ecuación, T es la temperatura del ambiente y P es la presión atmosférica medidas en el momento de realizar la irradiación. La Tabla 5 resume los resultados de los cálculos.

Tabla 5
Discrepancia entre la dosis prescrita y la dosis absorbida.

Dosis prescrita (cGy)	F_c (Gy/C)	Carga liberada promedio en el haz a 90° (nC)	K_{TP}	Dosis absorbida en el haz a 90° (cGy)	Carga liberada promedio en el haz a 270° (nC)	K_{TP}	Dosis absorbida en el haz a 270° (cGy)	Dosis total absorbida (cGy)	Discrepancia entre la dosis absorbida prescrita y la dosis absorbida (%)
30	51350000	2,5653	1,13507	15,0	2,5745	1,13366	14,9	29,9	0,333
50	51350000	4,2649	1,1352	24,9	4,2831	1,1337	24,9	49,8	0,4
100	51350000	8,5160	1,1352	49,6	8,5570	1,1337	49,8	99,4	0,6
150	51350000	12,764	1,1353	74,4	12,8264	1,1340	74,7	149,1	0,6
200	51350000	17,0133	1,1324	98,9	17,0958	1,1342	99,6	198,5	0,75
250	51350000	21,3527	1,1358	124,5	21,4552	1,1346	125	249,5	0,2
300	51350000	25,5876	1,1359	149,2	25,7336	1,1346	149,9	299,1	0,3

Fuente: Elaboración propia a partir de la investigación, 2020

Como se muestra en la Tabla 5, todas las discrepancias entre las dosis absorbidas entregadas por el equipo y las dosis absorbidas en el punto de interés, ubicado a 14,55 cm, fueron menores al 2%. Esto indica que las dosis entregadas por el equipo y las dosis absorbidas son equivalentes.

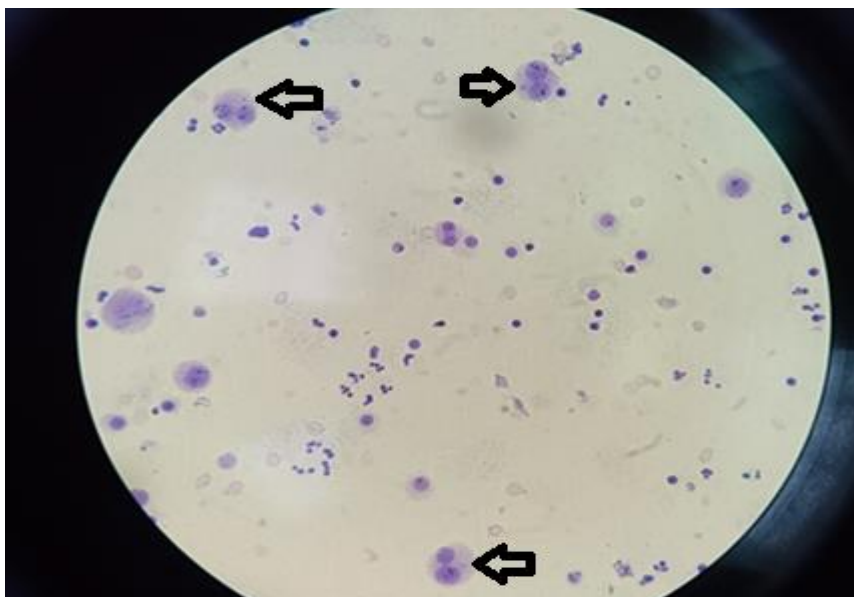
6.2 Resultado 2: Determinación del efecto biológico producido en las muestras de sangre periférica, debido a la irradiación in-vitro con rayos gamma de una fuente radiactiva de Co-60.

La observación del efecto biológico se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por el OIEA (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014). Después de realizar todas las irradiaciones y los procesos de siembra y cosecha celular, se observó un claro aumento de los micronúcleos producidos conforme se analizaban muestras de sangre a mayor dosis absorbida.

En total, se analizaron 24 000 células binucleadas de forma manual con ayuda del microscopio óptico. La Figura 27 muestra algunas CBN con MN. La Figura 28 muestra una CBN con 2 MN. Ambas fotografías fueron tomadas directamente desde el ocular del microscopio mientras se realizaban los conteos.

Figura 27

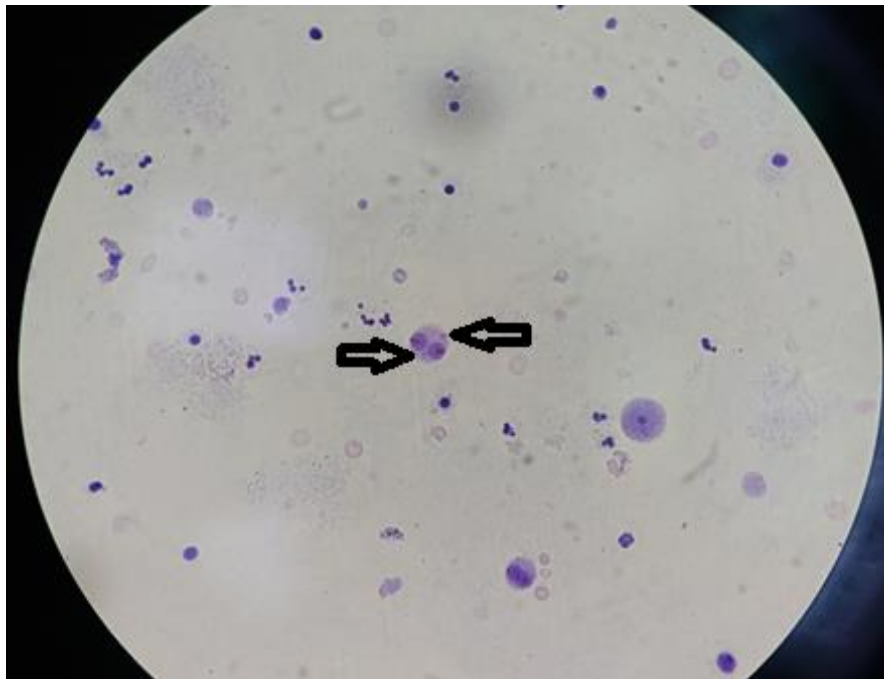
Células binucleadas con MN.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

Figura 28

Célula binucleada con dos MN.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

La mitad de las células binucleadas analizadas fueron del donante masculino, la otra mitad del donante femenino. El conteo de ambos sexos se combinó para mostrar un conteo total y producir una población estadística combinada. Para las dosis absorbidas bajas (0 Gy; 0,3 Gy y 0,5 Gy) se analizaron 4000 CBN (el doble de CBN que para las demás dosis) pues al ser dosis relativamente pequeñas, la observación de MN es muy baja y se recomienda aumentar la cantidad de CBN analizadas (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014).

La Tabla 6 resume la cantidad de células binucleadas analizadas para cada dosis absorbida, así como el total de micronúcleos producidos para cada punto de dosis absorbida.

Tabla 6

Cantidad de micronúcleos hallados para cada una de las dosis absorbidas en sangre.

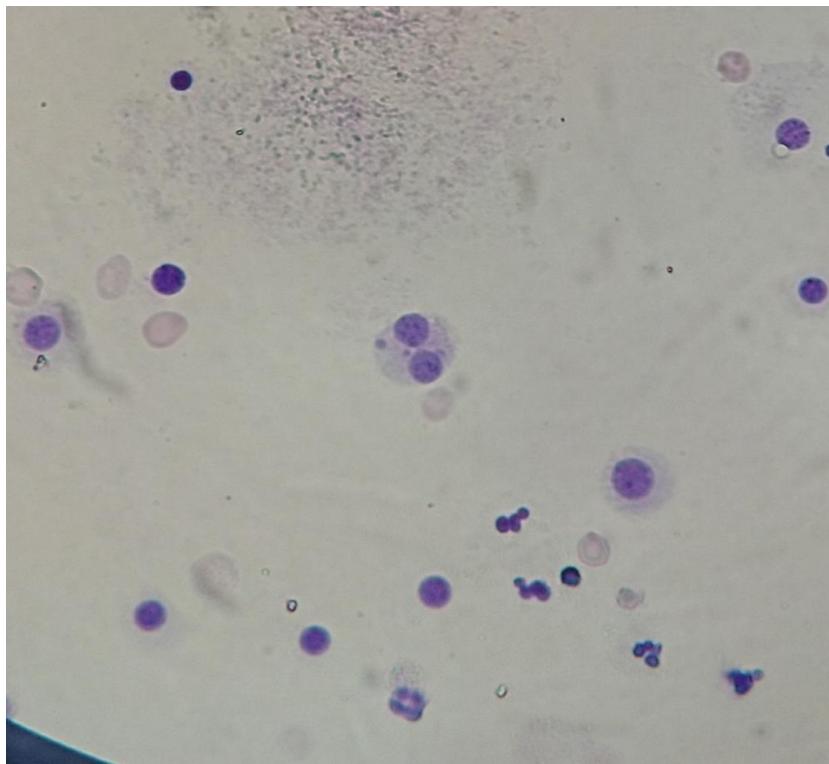
Dosis absorbida (Gy)	Cantidad de células binucleadas analizadas	Total de micronúcleos para cada punto de dosis
0	4000	22
0,3	4000	42
0,5	4000	60
1	2000	50
1,5	2000	89
2	2000	164
2,5	2000	241
3	2000	354
4	2000	467

Fuente: Elaboración propia a partir de la investigación, 2020

Se observó que a mayor dosis absorbida, además de aumentar la cantidad de CBN que presentaban MN, algunas CBN mostraban mayor multiplicidad de MN. Por ejemplo, en la Figura 29 se observa una CBN con 3 micronúcleos (en el centro de la imagen), la cual es una muestra de sangre irradiada con 4 Gy.

Figura 29

Célula binucleada con tres micronúcleos. La dosis absorbida es de 4Gy.



Fuente: Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

En la Tabla 7 se presenta la cantidad de MN hallados en una misma CBN, para cada dosis absorbida. Se observa que para la dosis absorbida de 0 gray (basal) se produce solamente 1 MN en cada CBN. Para las demás dosis absorbidas bajas (0,3 Gy y 0,5 Gy), la mayoría de las CBN con micronúcleos, presentan un solo MN. Para las dosis mayores a 2 Gy, la cantidad de CBN con 2 micronúcleos va aumentando progresivamente.

Tabla 7
Cantidad de MN hallados en una misma CBN.

Dosis absorbida (Gy)	Células con 1 MN	Células con 2 MN	Células con 3 MN	Células con 4 MN
0	22	0	0	0
0,3	40	1	0	0
0,5	58	1	0	0
1	46	2	0	0
1,5	85	2	0	0
2	150	7	0	0
2,5	197	22	0	0
3	302	26	0	0
4	378	35	5	1

Fuente: Elaboración propia a partir de la investigación, 2020

Las muestras de sangre irradiadas con la dosis absorbida más alta, es decir, la de 4 Gy, presentaron la mayor multiplicidad de MN: en cinco células binucleadas se hallaron tres micronúcleos, además, en una misma CBN se hallaron incluso 4 micronúcleos.

6.3 Resultado 3: Establecimiento de la relación dosis–respuesta mediante la generación de una curva de efecto biológico en función de diferentes dosis de rayos gamma, con base en el Modelo Lineal-Cuadrático.

Para generar la curva de efecto biológico, se siguió el procedimiento establecido en el Anexo 4, basado en el uso del software *Dose Estimate V5.2* (Ainsbury, L., 2010). Utilizando los datos mostrados en las Tablas 6 y 7, se obtuvieron las frecuencias de aparición totales de MN para cada punto de dosis. La Tabla 8 muestra los resultados, en los cuales se observa un crecimiento de la frecuencia conforme aumenta la dosis absorbida.

Tabla 8*Frecuencia de aparición de MN en la muestra combinada.*

<i>Dosis absorbida (Gy)</i>	<i>Cantidad de células binucleadas analizadas</i>	<i>Total de micronúcleos</i>	<i>Frecuencia de aparición de MN</i>	<i>U-test</i>
0	4000	22	0,0055	-0,24
0,3	4000	42	0,0105	1,69
0,5	4000	60	0,015	0,838
1	2000	50	0,025	1,77
1,5	2000	89	0,0445	0,03
2	2000	164	0,082	0,123
2,5	2000	241	0,1205	1,98
3	2000	354	0,177	-0,824
4	2000	467	0,2335	0,47

Fuente: Elaboración propia a partir de la investigación, 2020

Con respecto al análisis estadístico de la curva, se reitera que el modelo utilizado presupone una distribución de Poisson, en la cual se describe el número de veces que se presenta un evento poco probable durante cierto intervalo. El software *Dose Estimate V5.2* realizó automáticamente la evaluación para verificar que la estadística cumplía con dicha distribución. Esta herramienta informática, además de generar los coeficientes c , α y β , realizó el cálculo de la varianza y del estadístico u-test con base en la distribución de aberraciones (Ainsbury, E. & Lloyd, D., 2010). Para hallar los valores de c , α y β , el software utiliza el método de mínimos cuadrados iterativamente reponderados (Kelley, C., 1999).

Asimismo, utilizando *Dose Estimate V5.2* se calculó la bondad de ajuste para el modelo lineal-cuadrático, las probabilidades asociadas a los coeficientes de la curva, los valores de la U de Papworth y del índice de dispersión (σ^2/y) mostrados en la Figura 30.

Figura 30*Resultados del software Dose Estimate V5.2.*

<p>Results:</p> <p>ML_Linear-Quadratic_Fit_Yield = 0,0054 (+/- 0,0017) + 0,0127 (+/- 0,0052) * D + 0,0120 (+/- 0,0018) * D^2</p> <p>Weighted Chi Squared = 15,6300, Degrees of Freedom = 6, p value for goodness of fit = 0,6720</p> <p>p values for coefficients (z-test): p_A = 0,0192, p_alpha = 0,0515 p_beta = 0,0006</p> <p>Correlation coefficient, r = 0,9892</p>

Fuente: Ainsbury, L. (2010).

En la Figura 30 se muestran los valores c , α y β para un ajuste basado en el modelo lineal-cuadrático. También se observa una correlación de 0,9892 y bondad de ajuste del modelo de 0,672. Asimismo, el valor obtenido para Chi cuadrado ponderado es de 15,63. A partir de los valores c , α y β , se obtuvo la ecuación:

$$y(D) = 0,0054 + 0,0127D + 0,012D^2 \quad (6)$$

La curva anterior, según el modelo LQ, presenta los siguientes valores con su respectiva incertidumbre:

$$c = 0,0054 \pm 0,0017 \text{ (frecuencia basal de MN)}$$

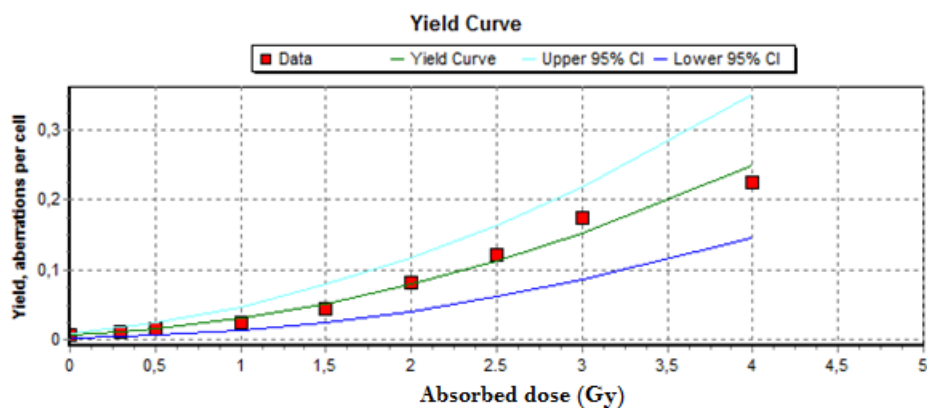
$$\alpha = 0,0127 \pm 0,0052 \text{ Gy}^{-1}$$

$$\beta = 0,012 \pm 0,0018 \text{ Gy}^{-2}$$

Para la correlación de la curva de ajuste (r) se obtuvo un valor de 0,9892. El valor de la bondad del ajuste obtenido (p) fue de 0,6720. La graficación de la curva obtenida (frecuencia de aparición de MN en función de la dosis absorbida), así como los niveles de confianza al 95% (Lind, D., Marchal, W. y Wathen, S., 2012), se observan en la Figura 31.

Figura 31

Gráfica de la frecuencia de MN (“Yield, aberrations per cell”) en función de la dosis absorbida (“Dose”) desde 0 Gy hasta 4 Gy. La línea celeste muestra el nivel de confianza superior, la línea azul muestra el nivel de confianza inferior, ambos a 95% de confianza.



Fuente: Ainsbury, L. (2010).

En concreto, se logró desarrollar la curva que modela el efecto biológico producido por radiación gamma (y), en función de la dosis absorbida en la sangre (D). La curva obtenida se representa mediante la ecuación (4):

$$y(D) = (0,0120 \text{ Gy}^{-2})D^2 + (0,0127 \text{ Gy}^{-1})D + 0,0054 \quad (7)$$

La eficacia de la curva para realizar estimación de dosis absorbida en sangre, se cuantificó mediante el análisis de dos muestras incógnitas: sangre irradiada con una dosis absorbida desconocida. Ambas incógnitas se irradiaron en las mismas condiciones de las muestras de sangre que sirvieron para realizar la curva de efecto biológico, pero en el proceso de estas irradiaciones solamente el Físico Médico encargado de radioterapia conocía las dosis absorbidas reales.

Después de realizadas las irradiaciones, la encargada de transportar las muestras al Laboratorio de Citogenética del INISA cambió la identificación de las muestras de sangre, asignando un nuevo código que solamente conocía otro funcionario del laboratorio. Posteriormente, las muestras fueron entregadas a la persona encargada del conteo de los MN con esa nueva codificación, asegurando que el analista no conocería la dosis realmente absorbida en ellas.

Para cada una de las incógnitas se analizaron 1000 células binucleadas, así como la distribución de MN en cada incógnita. La Tabla 9 resume los resultados de ambas incógnitas.

Tabla 9

Resultados del análisis de MN de dos muestras incógnitas irradiadas con dosis absorbidas desconocidas

Incógnita	Células con 1 MN	Células con 2 MN	Células con 3 MN	Células con 4 MN	Total de Micronúcleos observados	Dosis absorbida estimada con la curva de efecto biológico (Gy)	Dosis absorbida real impartida (Gy)	Discrepancia entre la dosis absorbida real y la dosis absorbida estimada.
1	134	8	0	0	150	2,982 ± 0,308	2,5	16%
2	137	9	0	1	159	3,087 ± 0,313	3	2,82%

Fuente: Elaboración propia a partir de la investigación, 2020

A partir de la curva de efecto biológico se realiza la estimación de dosis absorbida y se compara con la dosis absorbida realmente impartida, obteniéndose discrepancias de 16% en la primera incógnita y 2,82% en la segunda incógnita.

7. Discusión

Como se ha mencionado anteriormente, el maniquí de agua adquirido y utilizado para llevar a cabo esta tesis, no fue diseñado para irradiar muestras de sangre, por lo cual fue necesario verificar aspectos dosimétricos relevantes. Para que las irradiaciones de las muestras de sangre fueran siempre homogéneas y cumplieran con la dosis absorbida prescrita, se debían realizar al menos dos haces opuestos con la misma intensidad, pero debido a que las caras de irradiación no poseen las mismas dimensiones (una es más gruesa que la otra) se debía calcular cuál sería la ubicación del centro de irradiación del maniquí, o sea, la posición en la cual debe colocarse el soporte de acrílico con las muestras de sangre. Este cálculo teórico se realizó con base en las dimensiones del maniquí y las proporciones obtenidas de los coeficientes de atenuación lineal para agua y PMMA, tomando en cuenta que el centro de irradiación del maniquí es la posición en la cual debe colocarse el soporte de acrílico con las muestras de sangre.

Para que el maniquí sea utilizado en el futuro de la forma más sencilla posible, los cálculos se realizaron considerando irradiaciones isocéntricas. En la ecuación (4) se obtuvo que $\frac{\mu_{PMMA}}{\mu_{agua}} = 1,16$. Este resultado es sumamente importante pues quiere decir que, en el caso de haces de fotones de 1,25 MeV (como los rayos gamma de la fuente de cobalto utilizada), recorrer una distancia de 1 cm en agua es equivalente a recorrer 1,16 cm en PMMA; en otras palabras, el haz se atenúa lo mismo en 1 cm de agua que en 1,16 cm de PMMA.

El resultado teórico obtenido, mostró que el centro de irradiación del maniquí debía colocarse a 14,4 cm del borde interno de la ventana de irradiación. De esta manera, la dosis absorbida entregada por el haz a 90° sería igual a la dosis absorbida entregada por su haz opuesto (a 270°). Para corroborarlo, se realizaron 10 irradiaciones de prueba, con dosis absorbidas que iban desde los 30 cGy hasta los 300 cGy. Cada una de esas dosis absorbida fue entregada con dos haces opuestos (cada haz con la mitad de la dosis). Sin embargo, para las dosis absorbidas de 300 cGy, 250 cGy y 200 cGy, los haces mostraron discrepancias de 1,5%, 2,2% y 2,4%, respectivamente. Esto quería decir que la diferencia entre los dos haces opuestos para esas dosis era significativa, y de esta manera no se cumpliría con la homogeneidad de la dosis absorbida. Las discrepancias podrían fundamentarse en las

incertidumbres debidas a la alineación de los rayos láser de la sala de tratamiento, a la colocación del maniquí de agua en la camilla, a la rotación propia del gantry, el tiempo de tránsito de la fuente y la calibración del telémetro. Además, la regla para medir la ubicación del centro de irradiación en el maniquí está graduada en centímetros, y su menor valor de escala son milímetros.

Como estos valores fueron superiores al 2% recomendado, se decidió corregir empíricamente la posición del centro de irradiación, desplazándolo gradualmente desde el valor teórico (14,4 cm) hasta que la intensidad de cada haz fuese lo más parecida posible. Se determinó que el punto que optimizaba las mediciones se ubicaba a 14,55 cm (una diferencia de 1,5 mm con respecto al valor teórico). Utilizando esta nueva posición para el centro de irradiación, se realizaron nuevas mediciones. En estas nuevas mediciones resumidas en la Tabla 4, la mayor discrepancia obtenida fue de 0,57%. Con este resultado se corrobora que el centro de irradiación obtenido es el adecuado.

Utilizando la posición de 14,55 cm para irradiar las muestras de sangre, se calculó la dosis absorbida entregada por el equipo (prescrita) y la dosis absorbida en las muestras de sangre. Estos resultados se mostraron en la Tabla 5. La mayor discrepancia fue de 0,75%, cumpliendo con el valor máximo posible del 2%, por lo cual, se determina que, siguiendo las consideraciones dosimétricas mencionadas en este documento, el maniquí de agua es apto para realizar irradiaciones de muestras de sangre.

Después de conocer las condiciones dosimétricas a seguir durante todas las irradiaciones que utilizarían el maniquí de agua, se procedió a realizar las irradiaciones de las muestras de sangre de ambos donantes. Según se muestra en la Tabla 6, se observó un claro aumento de los MN producidos conforme la dosis absorbida aumentaba. Este efecto es el esperado, pues según M. Fenech y M. Volders (Fenech, M., et al, 2011), entre más dosis es absorbida por las células, mayor es el daño producido en las hebras de ADN, así como la cantidad de fragmentos de cromosomas que quedan rezagados durante el ciclo de anafase. Estos fragmentos eventualmente fueron encerrados por una membrana celular y consecuentemente se transformaron en MN, los cuales se contabilizaron para cada punto de dosis.

A partir de los datos de la Tabla 6 y la Tabla 7, se observa que el efecto biológico producido en los linfocitos, debido a la absorción de rayos gamma, es mayor conforme aumenta la dosis absorbida. Siendo más específico, se evidencian los siguientes dos resultados:

1. Al aumentar la dosis absorbida, la cantidad de células que presentaron MN fue cada vez mayor, i.e, la aparición de MN es proporcional a la dosis absorbida.

Por ejemplo, con base en la Tabla 6, el total de micronúcleos basales para la muestra combinada (masculino más femenino) fue de 22 MN, mientras que para una dosis absorbida de 0,3 Gy el número observado fue de 42 MN, es decir, prácticamente el doble de la cantidad basal. Asimismo, para la dosis absorbida de 2,5 Gy se observó una cantidad de 241 MN, mientras que para la dosis absorbida de 4 Gy (el mayor punto de dosis) se observó una cantidad de 467 MN, nuevamente, prácticamente el doble de MN que para el punto de 2,5 Gy. Los datos muestran que cada cierto aumento en la dosis absorbida, el número de MN se duplicaba. Esta tendencia era indicio de una función cuadrática.

2. Al aumentar la dosis absorbida, aumentó la cantidad de MN expresados en una misma célula, i.e, la multiplicidad de MN es proporcional a la dosis absorbida.

Por ejemplo, según la Tabla 7, cuando no hay dosis absorbida en la sangre (punto basal con 0 Gy) solamente se hallaron células con 1 MN. Ninguna célula en el nivel basal mostró más de 1 MN. Para el punto de 0,3 Gy se halló una célula que contenía 2 MN. Lo mismo sucedió para la dosis absorbida de 0,5 Gy. Para las dosis absorbidas de 1 Gy y 1,5 Gy, se hallaron dos células con 2 MN, mientras que para el punto de dosis de 2 Gy, la cantidad de MN en una misma célula creció enormemente: hubo 7 células en las cuales se contaron 2 MN. Así sucesivamente, el número de MN en las células fue aumentando de forma progresiva, al grado que en la mayor de las dosis absorbidas (punto de 4 Gy), se contaron 35 células con 2 MN; 5 células con 3 MN e incluso una célula con 4 micronúcleos. Esto implica que no solo el número de MN crece de forma proporcional a la dosis absorbida, sino que la cantidad de MN en una misma célula es cada vez mayor, lo cual está estrictamente relacionado con el efecto producido a cada célula: el daño genético aumentaba conforme se absorbía más radiación.

Diferentes laboratorios de dosimetría biológica en varios países que colaboran con los proyectos de citogenética de América Latina, han publicado sus resultados (García, O., Ramalho, A., Di Giorgio, M., Mir, S., Espinoza, M., Manzano, J., Nasazzi, N. & López, I., 1995), los cuales se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10

Frecuencia de aparición de MN para 4 puntos de dosis utilizando el bloqueo de la citocinesis, en cinco laboratorios de citogenética de Latinoamérica.

Dosis absorbida (Gy)	Laboratorio	Células contadas	Micronúcleos observados	Frecuencia de aparición de micronúcleos	U-test
0	1	1200	16	0,013	2,85
	2	1000	15	0,015	12,03
	3	1000	9	0,009	-0,19
	4	905	16	0,018	2,38
	5	500	10	0,020	3,04
0,75	1	1300	77	0,059	7,17
	2	1000	53	0,053	8,2
	3	647	36	0,056	5,1
	4	721	52	0,072	5,28
	5	500	42	0,084	8,6
1,5	1	1004	124	0,123	3,05
	2	1000	207	0,207	4,05
	3	891	158	0,177	1,36
	4	794	98	0,123	0,41
	5	500	146	0,292	9,32
3,0	1	1200	357	0,297	9,22
	2	1000	536	0,536	9,33
	3	836	256	0,306	4,16
	4	905	235	0,260	6,1
	5	510	245	0,480	5,54

Fuente: García, O., Ramalho, A., Di Giorgio, M., Mir, S., Espinoza, M., Manzano, J., Nasazzi, N. & López, I. (1995).

Al analizar los resultados de la Tabla 10, se observa una frecuencia basal que osciló entre 0,009 y 0,02, mientras que en esta investigación se halló un valor de 0,0055. Para el caso de 1,5 Gy, la frecuencia en los demás países osciló entre 0,123 y 0,292, mientras que para esta investigación fue de 0,0445. Para el punto de 3 Gy, los demás laboratorios mostraron frecuencias entre 0,26 y 0,536, mientras que en esta investigación se observó un valor de 0,177.

Los resultados de la frecuencia de aparición de MN en los laboratorios mencionados son claramente mayores a los observados en esta investigación. La diferencia podría estar relacionada con el conteo de los micronúcleos: la observación de las CBN y el conteo de los

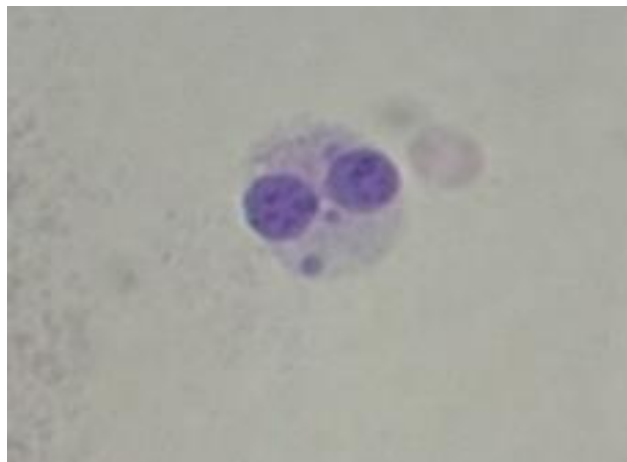
MN fue realizado por los mismos donantes de la sangre irradiada para esta investigación, cada uno realizó un conteo visual con el microscopio óptico, y las diferencias entre dichos conteos se ven influenciadas en aspectos ópticos como la agudeza visual y la luminosidad, así como la experiencia y capacitación de los analistas.

Cabe destacar que para realizar el conteo de los MN siempre se siguieron los criterios establecidos por el OIEA en la Tabla 1 de este documento, sin embargo, a pesar de apearse estrictamente a dichos criterios, y de llevar un entrenamiento previo en el *Taller de Técnicas cito-moleculares aplicadas a la toxicología genética*, ninguno de los analistas era completamente experto en este campo, por lo cual es muy posible que no se contaran todos los MN existentes en la población celular analizada. Incluso es muy probable que sí se produjeran dichos MN a partir de las lesiones del material genético, pero que al estar muy “al límite” de los criterios de selección, se haya decidido omitirlos del conteo, pues en la práctica hay muchas ocasiones donde el criterio de selección queda al límite de lo subjetivo, y para elegir si se contabiliza o no el MN, la experiencia del analista juega un papel fundamental. A esto debemos añadir la calidad del contraste utilizado en la tinción del material cito-genético, el cual en ocasiones podría no ser el adecuado para obtener una clara diferenciación entre artefactos que no clasifican como micronúcleos, y otros que, con una mayor calidad de imagen, sí podrían clasificarse como tal.

Por ejemplo, en la Figura 32 se observa una CBN con un fragmento nuclear (posiblemente cromosomas) que podría ser efectivamente contabilizado como un MN para cierto observador, pero otro observador podría no considerarlo como tal, pues a pesar de que claramente los dos fragmentos cromosómicos inferiores se contabilizan como MN, el cuerpo extra nuclear ubicado en la parte superior del núcleo principal de la derecha no cuenta con una simetría suficientemente circular y se halla levemente traslapado con el NP.

Figura 32

Células binucleada que muestra dos claros micronúcleos ubicados en la parte inferior del citoplasma, y un cuerpo extra nuclear ubicado arriba del núcleo principal de la derecha, que podría o no ser considerado como MN.



Fuente: Tomada por Carrillo, Rónald, (2019).

Considerando estos aspectos, la cantidad de MN en esta célula binucleada podría ser 2 o 3, dependiendo del criterio individual, y este tipo de situaciones surgen con normalidad en el conteo de MN, especialmente en poblaciones grandes como lo es el caso del estudio en cuestión. Por lo cual, se proponen otros métodos de tinción complementarios al Giemsa como yoduro de propidio (Varga, D., Johannes, T., Jainta, S., Schuster, S., Schwarz-Boeger, U., Kiechle, M., Patino, B. & Vogel, W., 2004) o el tratamiento de ARNasa (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014) que permitan mejorar el contraste de la lámina y por ende la lectura manual de la misma.

Otras de las razones que pueden explicar la diferencia entre las frecuencias de aparición de MN pueden estar vinculadas a la efectividad biológica relativa (International Atomic Energy Agency, 2005) de los fotones de rayos gamma, pues este tipo de RI posee una baja transferencia lineal de energía, y a pesar de que existe posibilidad de interactuar directamente con la molécula de ADN, la mayor proporción de interacciones es realizada de forma indirecta (International Atomic Energy Agency, 2005), es decir, sobre otras moléculas cercanas como las del agua, ocasionando una gran producción de radicales libres (International Union of Pure and Applied Chemistry, 2014) de la forma OH \cdot . Alrededor de dos terceras partes del daño radioinducido por radiaciones de baja LET es originado de esta manera (International Atomic Energy Agency, 2005), y dado que gran cantidad de estos

radicales libres pueden ser neutralizados por moléculas donadoras de iones H (Soriano del Castillo, J. y Montoro, A., 2013), las lesiones producidas serán más fáciles de reparar, por lo que habrá una menor generación de MN.

Para finalizar esta comparación, es importante resaltar que según la Tabla 10, 17 de los 20 conteos no cumplen con la prueba de la U, pues sus valores salen del rango de $\pm 1,96$. Esto indica que la mayoría de los conteos realizados por estos laboratorios no cumplen con una distribución de Poisson, por lo cual hay mucha discrepancia entre los valores hallados y los valores esperados.

Todas las razones mencionadas anteriormente conducen a la misma conclusión a nivel global: es de vital importancia que los analistas involucrados posean una amplia experiencia en la observación de los biomarcadores, y que sus criterios de evaluación sean lo más parecidos posibles para que la subjetividad no sea un factor predominante en el análisis de los MN.

Ahora bien, incluso considerando que la frecuencia de aparición de MN para este estudio es inferior a los valores encontrados en estudios de otros países, se pudo determinar claramente que dicha frecuencia aumentaba de forma proporcional a la dosis absorbida, debido a que el daño biológico conllevaba una mayor producción de dicho biomarcador. Solamente hacía falta una función matemática que pudiera modelar ese daño. Para esta ecuación, primero se analizó la frecuencia con la cual aparecían los MN en las células, según cada punto de dosis. Su desarrollo se mostró previamente en la Tabla 8, y la ecuación obtenida tiene la forma matemática según la ecuación (6):

$$y(D) = 0,0054 + 0,0127D + 0,012D^2$$

A continuación se realizará un análisis de esta ecuación, desde la perspectiva estadística.

Para corroborar que el modelo matemático utilizado se comporta siguiendo una distribución de Poisson, se analizaron los valores obtenidos de la U de Papworth y del índice de dispersión, el cual se define como la varianza dividida entre la media (Ainsbury, L., 2010).

Estos valores fueron calculados automáticamente mediante el Dose Estimate V5.2 y sus resultados se observan en la Figura 33.

Figura 33

Valores del índice de dispersión (Var/mean) y valores de la U-test, así como sus respectivas desviaciones estándar.

Dose, Gy	Cells	Aberrations	D0	D1	D2	D3	D4	Yield	SE Yield	Var/Mean	SE V/M	U	NDI	SE NDI
0	4000	22	3978	22	0	0	0	0,005	0,001	0,995	0,022	-0,240	1,000	0,000
0,3	4003	42	3962	40	1	0	0	0,010	0,002	1,040	0,022	1,690	1,020	0,013
0,5	4000	60	3941	58	1	0	0	0,015	0,002	1,020	0,022	0,838	1,020	0,019
1	2001	50	1953	46	2	0	0	0,025	0,004	1,060	0,031	1,770	1,040	0,040
1,5	2000	89	1913	85	2	0	0	0,044	0,005	1,000	0,031	0,030	1,020	0,079
2	2000	164	1843	150	7	0	0	0,082	0,006	1,000	0,032	0,123	1,040	0,243
2,5	2000	241	1781	197	22	0	0	0,120	0,008	1,060	0,032	1,980	1,100	0,459
3	2045	354	1717	302	26	0	0	0,173	0,009	0,974	0,031	-0,824	1,080	0,814
4	2069	467	1650	378	35	5	1	0,226	0,010	1,010	0,031	0,470	1,110	1,320

Fuente: Ainsbury, L. (2010)

Como se observa en la figura anterior, todos los valores del índice de dispersión son prácticamente 1, lo que indica una alta conformidad con Poisson. Por otro lado, considerando que los valores de $|U| > 1,96$ indican una sobre-dispersión en los datos (Lind, D., Marchal, W. y Wathen, S., 2012), será necesario que los valores de U estén dentro de este rango.

A partir de los datos mostrados en la Tabla 8y la Figura 33, se observa que prácticamente todos los puntos de dosis se hallan en el rango de -1,96 a 1,96; esto confirma que la generación de MN ciertamente se considera como un evento poco probable pero bien modelado a partir de Poisson, y que al ser los rayos gamma una RI de baja transferencia lineal de energía, la distribución del daño en las células se da de manera aleatoria, justo como es esperado.

Sin embargo, el punto de dosis absorbida de 2,5 Gy mostró un valor $U = 1,98$. Esta cifra es levemente mayor al valor extremo, e indica una leve sobre dispersión de los datos, por lo que para esta dosis absorbida en específico no se cumple con Poisson. No obstante, según el OIEA (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014), es de esperarse que en el ensayo de micronúcleos se presenten algunas sobre dispersiones, pues la cantidad de MN también puede ser afectada por otros agentes genotóxicos, como lo son la contaminación ambiental, estrés laboral y horarios deficientes de sueño.

A pesar de que los eventos descritos por una distribución de Poisson son matemáticamente poco probables, se supone que su probabilidad de aparición es proporcional al tamaño de dicho intervalo (el cual en este caso corresponde a la dosis absorbida) (Lind, D., Marchal, W. y Wathen, S., 2012). Esto se corroboró en los resultados mostrados en la Tabla 7, pues la aparición de MN en las células –a pesar de ser eventos improbables- va creciendo conforme se aumenta la dosis absorbida, y además, la cantidad de MN en una misma célula también crece en función de la cantidad de radiación absorbida, pero su multiplicidad aumenta solamente para dosis absorbidas altas, pues para dosis absorbidas bajas, la probabilidad de hallar células con varios MN fue pequeña.

Con respecto a la correlación basada en un ajuste lineal-cuadrático, a partir de los resultados del software Dose Estimate V5.2 mostrados en la Figura 30, se observa una correlación de 0,9892. Esta correlación es prácticamente 1, lo cual nos indica que la ecuación utilizada para modelar el daño biológico se ajusta perfectamente a una ecuación polinomial de orden 2. Es decir, la ecuación cuadrática predicha por el MLQ se manifiesta inequívocamente en la curva de efecto biológico obtenida.

En cuanto a la verificación de hipótesis para validar el uso de una distribución de Poisson, la bondad de ajuste calculada mediante el programa Dose Estimate está basada en las premisas de la Tabla 11.

Tabla 11

Establecimiento de las hipótesis con relación a la bondad de ajuste de la curva y la producción de MN.

Hipótesis nula (H0):	La cantidad de MN observados no difiere de la esperada por el modelo de Poisson.
Hipótesis alternativa (H1):	La cantidad de MN observados es distinta a la esperada por el modelo Poisson.

Fuente: Ainsbury, L. (2010)

Como es sabido, el rechazo de la hipótesis nula implicaría una aceptación de la hipótesis alternativa, pero se debe tener certeza de este rechazo. La probabilidad de rechazar a H0 cuando es verdadera -y de esta forma, el riesgo- se mide a partir del nivel de significancia (Lind, D., Marchal, W. y Wathen, S., 2012). El nivel de significancia utilizado en el Dose Estimate es del 5%, por lo cual, un valor menor a 0,05 indicaría que existe baja

probabilidad de que H_0 sea verdadera, i.e. existiría gran diferencia entre la producción real de MN (la observada) y la que se espera a partir de la distribución de Poisson. Por otra parte, un valor mayor a 0,5 indicaría que no existe razón para rechazar H_0 , por lo cual se aceptaría como verdadera. A partir de los resultados del software Dose Estimate (Figura 30) se observa que la bondad de ajuste es de 0,672; por lo cual se acepta H_0 , indicando que la cantidad de MN producidos es la esperada por el modelo de Poisson.

Con respecto a los valores numéricos de alfa y beta, al ser estos los coeficientes numéricos de una ecuación teóricamente lineal-cuadrática, se desea conocer qué tan bien se ajustan dichos coeficientes a una ecuación de ese tipo, y no, por ejemplo, a otro modelo matemáticamente teórico más sencillo como el lineal. Esto quiere decir que tanto alfa como beta deben ser valores distintos de cero, pues si alguno de ellos se anula, la ecuación perdería su forma lineal-cuadrática. De esta manera se define que la hipótesis nula H_0 para ambos coeficientes será que el coeficiente no difiere de cero, mientras que la hipótesis alternativa H_1 será que el coeficiente sí difiere de cero. Esta hipótesis alternativa es la que se busca aceptar, con el subsecuente de H_1 .

Para interpretar la aceptación o rechazo de las hipótesis con respecto a los coeficientes alfa y beta, se deben seguir los criterios establecidos en la Tabla 12.

Tabla 12

Relación entre los valores de p y la interpretación de la hipótesis nula.

Valor de p	Interpretación
< 0,1	Hay <i>cierta</i> evidencia de que H_0 no es verdadera.
< 0,05	Hay evidencia <i>fuerte</i> de que H_0 no es verdadera.
< 0,01	Hay evidencia <i>muy fuerte</i> de que H_0 no es verdadera.
< 0,001	Hay evidencia <i>extremadamente fuerte</i> de que H_0 no es verdadera.

Fuente: Elaboración propia a partir de la investigación, 2020

Al considerar los resultados de la Figura 30, mostrada en la sección de Resultados, se observa que para el caso del coeficiente alfa, el valor de p es 0,0515, mientras que para el coeficiente beta, su valor p es 0,0006.

Para el coeficiente alfa, el cual posee un valor de p cercano a 0,05, se sugiere que existe *evidencia* de que H0 no es verdadera, mientras que para el coeficiente beta, hay evidencia *extremadamente fuerte* de que H0 no es verdadera. Con ambos resultados se permite rechazar H0, demostrando que el modelo lineal-cuadrático es adecuado para esta distribución de datos.

Desde la perspectiva radiobiológica, al analizar los coeficientes de la ecuación según los conceptos fundamentados en el modelo LQ, se nos presenta los siguientes valores con sus respectivas unidades e incertidumbres:

$$c = 0,0054 \pm 0,0017$$

$$\alpha = 0,0127 \pm ,0052 [Gy^{-1}]$$

$$\beta = 0,012 \pm ,0018 [Gy^{-2}]$$

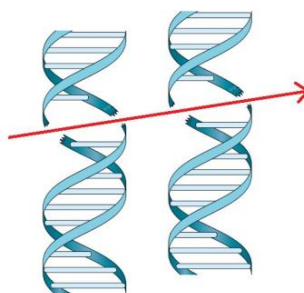
El valor de $c = 0,0054$, indica el mejor valor de ajuste para la frecuencia con la cual aparecen los MN en las células analizadas cuando no hay fuentes externas de radiación. Previamente se comentó que es de esperarse un valor bajo, pues la probabilidad de generación espontánea de MN en los seres humanos, aunque no es nula, es poco común. Al considerar su incertidumbre, el valor máximo y mínimo que se podría presentar es de 0,0071 y 0,0037, respectivamente.

En el caso de los coeficientes α y β , estos tienen asociadas características tanto físicas como biológicas. El resultado de $\alpha = 0,0127 Gy^{-1}$ (considerando la incertidumbre, su máximo y mínimo posible serían $0,0179 Gy^{-1}$ y $0,0075 Gy^{-1}$, respectivamente), físicamente nos indica el crecimiento lineal de la aparición de MN en función de la dosis absorbida: a mayor dosis absorbida, mayor cantidad de MN, mientras que biológicamente se relaciona con el daño letal o directo experimentado por el material citogenético. Es importante resaltar que los MN no son en sí mismos una muerte celular, por lo cual, en el contexto de la producción de MN, el concepto de letalidad no se aplica de forma textual, sino que nos indica un daño contundente producido por la colisión directa de las partículas cargadas que fueron previamente ionizadas por la radiación, sobre el ADN. Es decir, un daño que no fue posible de enmendar por medio de los mecanismos de reparación celular, lo cual en este caso se manifiesta con la segregación del material genético fuera de los núcleos principales. Material genético que posteriormente se convirtió en MN. En este mismo

sentido, también se puede asociar el término alfa con el rompimiento de las hebras dobles de ADN por acción de una sola trayectoria (“one traction-action”) de radiación ionizante (International Atomic Energy Agency, 2008?), como se muestra en la Figura 34.

Figura 34

Rotura de dos cadenas dobles de ADN por acción de una misma partícula cargada, producto de la radiación ionizante.



Fuente: International Atomic Energy Agency. (2008)

Por otra parte, el valor de $\beta = 0,012 \text{ Gy}^{-2}$ (considerando la incertidumbre, su máximo y mínimo posible serían $0,0138 \text{ Gy}^{-2}$ y $0,0102 \text{ Gy}^{-2}$, respectivamente), físicamente nos muestra el crecimiento del daño con relación al cuadrado de la dosis absorbida, y biológicamente nos indica la proporción de los daños subletales experimentados en el material citogenético, es decir, lesiones que no fueron producidas por la acción directa de una única vía de la radiación, sino que se produjeron al acumularse pequeñas pero continuas colisiones de muchas partículas que primero fueron indirectamente ionizadas por la radiación, y que luego transmitieron parcialmente su energía al material genético, produciendo otra cantidad considerable de afecciones y con ello una mayor cantidad de micronúcleos.

El coeficiente β también muestra relación con la transferencia lineal de energía. El modelo matemático utilizado implica que en los casos donde el coeficiente β tiende a cero, el resultado sería más bien una ecuación lineal, pues se anularía su dependencia cuadrática. Este tratamiento sería aceptable si la transferencia lineal de energía fuera alta, como lo es para neutrones de fisión, partículas alfa o iones pesados (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014), mientras que en el caso de rayos gamma, donde la transferencia lineal de energía es baja, el ajuste debería considerar ambos coeficientes, resultando en una ecuación

cuadrática. Esto se evidencia en el resultado numérico de α y β (0,0127 y 0,012), pues ambos valores son muy similares, lo cual muestra que la irradiación fue realizada con fotones de rayos gamma y no con otros tipos de radiación ionizante.

Para realizar un análisis más riguroso de los valores obtenidos, se compararon los valores de α y β obtenidos en este estudio con los resultados de otros laboratorios. En el caso del estudio “Intercomparison in cytogenetic dosimetry among five laboratories from Latin America” (García et al, 1995), mencionado previamente, se muestran los resultados de 5 laboratorios de Latinoamérica para rayos gamma de Co-60. Además, el estudio “Strong Correlation among Three Biodosimetry Techniques Following Exposures to Ionizing Radiation”(Kang, C., Yun, H., Kim, H. & Kim, C., 2016) muestra los resultados del Korea Institute of Radiological and Medical Sciences (National Human Genome Research Institute, 2020). Todos los resultados se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13

Resultados de los coeficientes α y β para 4 laboratorios (no especificados) de Latinoamérica (el quinto laboratorio de dicho estudio no logró desarrollar la curva para MN), además de los resultados del Instituto Coreano de ciencias médicas y radiológicas, así como los resultados de esta investigación de la Universidad de Costa Rica.

Laboratorio	α ($\times 10^{-2}$) Gy ⁻¹	β ($\times 10^{-2}$) Gy ⁻²
1	7,15	1,76
2	5,24	3,15
3	1,48	3,33
4	4,29	1,87
5	-	-
Korea Institute	9,37	4,45
UCR	1,27	1,2

Fuente: National Human Genome Research Institute. (2020).

Como se observó, los valores de α y β hallados en esta investigación son levemente menores a los obtenidos en los otros estudios, aunque todos se ubican en el mismo orden de magnitud, es decir, 10^{-2} . Las pequeñas diferencias existentes se fundamentan especialmente

en la incertidumbre para llevar a cabo el conteo de los micronúcleos, y no representan una limitante significativa a la hora de realizar estimaciones de dosis absorbida.

Al haber considerado los aspectos estadísticos y radiobiológicos que dan validez a los coeficientes c , α y β de la curva de efecto biológico, se finalizará esta discusión con el análisis de los resultados obtenidos en las muestras que se irradiaron con dosis incógnitas, pues la finalidad ulterior de esta curva será su aplicación en situaciones donde se requiera estimar una dosis absorbida desconocida de radiación gamma, ya sea a pacientes, a personal ocupacionalmente expuesto o personas del público.

En la Tabla 9 de la sección de Resultados, se resumen los resultados obtenidos en las muestras que se irradiaron con dosis absorbidas incógnitas. La primera incógnita se había irradiado con una dosis absorbida de 2,5 Gy, mientras que la segunda incógnita se irradió a 3 Gy. Por supuesto, el analista no conocía el valor de dichas dosis absorbidas, y ambas irradiaciones, cultivo y cosecha celular, así como los conteos de MN se realizaron exactamente bajo las mismas condiciones.

Al utilizar la curva de efecto biológico para estimar la dosis absorbida de ambos casos (con previa observación de los MN producidos y su distribución de frecuencias), se obtuvieron valores de 2,982 Gy y 3,087 Gy, respectivamente. Para la primera incógnita se obtuvo una discrepancia de 16% con respecto a la dosis absorbida realmente administrada, mientras que para la segunda incógnita se obtuvo una discrepancia de 2,82% con respecto al valor real.

El valor de la primera incógnita resultó relativamente alejada de su valor real, pues considerando la incertidumbre asociada a su mediación, la cual es de $\pm 0,308$ Gy, su valor numérico se sale levemente del rango, produciendo la discrepancia mencionada de 16%. El caso de la segunda incógnita mejoró enormemente, provocando una discrepancia de apenas 2,82%, y obteniendo un valor que por supuesto se hallaba dentro del rango de la incertidumbre ($\pm 0,313$ Gy).

A pesar de que el valor de una incógnita resultó levemente por encima de la dosis absorbida real administrada, dicha incógnita mantenía el mismo orden de magnitud que el valor real. Es fundamental considerar este aspecto, pues la finalidad de la curva será realizar

una *estimación relativamente rápida de dosis absorbida*, la cual requiere menos trabajo de análisis en el laboratorio con respecto al trabajo necesario para estimar esas mismas dosis a partir de otros biomarcadores, como lo son el estudio de cromosomas dicéntricos (Organismo Internacional de Energía Atómica, 2014), o FISH (hibridación fluorescente in situ, por sus siglas en inglés) (National Human Genome Research Institute, 2020), además de que también en comparación con los demás biomarcadores, la siembra y cosecha celular se realiza más ágilmente, lo cual influye en la reducción del tiempo total necesario para emitir el resultado de la estimación de la dosis absorbida, y que de esta manera se puedan tomar rápidamente las acciones médicas en los casos donde las dosis absorbidas hayan sido altamente riesgosas.

Para finalizar, es importante retomar el hecho de que la precisión y robustez de la curva de efecto biológico mejorará enormemente conforme se realicen más análisis de micronúcleos y se añadan dichos conteos a la población estadística actual.

Siendo acorde a lo mencionado anteriormente, todos los datos, resultados y análisis obtenidos en el presente documento son donados al Instituto de Investigaciones en Salud de la Universidad de Costa Rica, a la República de Costa Rica y a la comunidad científica del mundo para su posterior uso e incluso para su perfeccionamiento, pues los modelos utilizados en la ciencia -los cuales tienen como propósito realizar buenas predicciones- solamente pueden mejorarse con trabajo duro por parte de una mejor ciencia.

8. Conclusiones

- Se validaron las condiciones dosimétricas necesarias para utilizar el maniquí de agua en la irradiación de las muestras de sangre. Para su uso, será necesario seguir todas las recomendaciones de este documento.
- Se determinó el efecto biológico de la radiación gamma en los linfocitos. Este efecto aumenta de forma proporcional al cuadrado de la dosis: a mayor dosis absorbida, aparece mayor cantidad de MN en una misma célula debido al daño citogenético.
- Se generó la ecuación que modela el efecto biológico. Esta ecuación es:

$$y(D) = (0,0120 \text{ Gy}^{-2})D^2 + (0,0127 \text{ Gy}^{-1})D + 0,0054$$

Con esta ecuación es posible estimar y/o predecir la cantidad de radiación absorbida en un individuo, ya sea en condiciones de accidente radiológico, accidente nuclear o para dosimetría biológica en pacientes, pero es necesario aumentar la población estadística para que pueda ser usada como curva de calibración.

9. Recomendaciones

- Mejorar la capacitación en conteo y análisis de MN, así como automatizar su proceso.
- Añadir más donantes de sangre a la población estadística para mejorar la robustez y precisión de la curva.
- Desarrollar un método que optimice la tinción de los linfocitos para mejorar el contraste y análisis de las CBN y sus MN.

10. Impacto del proyecto

La dosimetría biológica constituye un soporte necesario de los programas de Protección Radiológica Nacionales y de los Sistemas de Respuesta en Emergencias Radiológicas y Nucleares en el caso de sobreexposiciones accidentales o incidentales, individuales o a gran escala.

Este proyecto es una contribución al desarrollo de nuevas curvas de calibración para los diferentes ensayos que se continuarán implementando para el desarrollo del *Servicio de Dosimetría Biológica en Costa Rica*, liderado por el INISA y refleja los frutos del trabajo interdisciplinario para establecer:

- Vínculos con el INISA y el Ministerio de Salud para cooperación en las futuras irradiaciones, dosimetría, cálculos físicos y estadísticos en el ámbito de la Física Médica.
- Un aporte para incluir a Costa Rica como referente en la **Red Latinoamericana de Dosimetría Biológica**.

11. Referencias

- Ainsbury, E. & Lloyd, D. (2010). Dose estimation software for radiation biodosimetry. *Biologically based parameters*, 98 (2), 290-295). https://journals.lww.com/health-physics/Abstract/2010/02000/DOSE_ESTIMATION_SOFTWARE_FOR_RADIA_TION.27.aspx
- Ainsbury, L. (2010). *Cytogenetics dose estimation software*.
- Arredondo, C. (3-8 septiembre 2006). *Aspectos Vigentes en Chernobyl a Veinte Años del Accidente* [Discurso principal]. Primer Congreso Americano del IRPA, Acapulco México.
https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/37/115/37115853.pdf?r=1&r=1
- Beyzadeoglu, M., Ozyigit, G. & Cüneyt, E. (2010). *Basic Radiation Oncology*. Springer.
https://books.google.co.cr/books?id=EvAGyB2JtUoC&pg=PA104&lpg=PA104&dq=modelo+lq+raiobiolo&source=bl&ots=qLc8lhJIC-&sig=ACfU3U26eAJ-AIRGFfVvkP9t_gLggIZmRLQ&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwj1r7aP0v7rAhXvpVvKkHbqlBekQ6AEwA3oECAoQAQ#v=onepage&q=modelo%20lq%20raiobiolo&f=false
- Boada, A., Mandina, T., González, J., Romero, I. y García, O. (2011). Nuevas curvas de calibración para la dosimetría biológica en Cuba. *Nucleus*, (49), 3-8.
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/es/lil-738941>
- Caja Costarricense del Seguro Social. (2020). *Hospital San Juan de Dios*.
<https://www.ccss.sa.cr/hospitales?v=25>
- Comisión Europea y Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. (2003). *Fichas Internacionales de Seguridad Química*.
<https://web.archive.org/web/20150514134021/http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/1001a1100/nspn1043.pdf>
- Countryman, P. y Heddle, J. (1976). La producción de micronúcleos a partir de aberraciones cromosómicas en cultivos irradiados de linfocitos humanos. *Investigación de*

mutaciones, 41 (2/3), 321-331.
<https://inis.iaea.org/search/searchsinglerecord.aspx?recordsFor=SingleRecord&RN=8310250>

El Organismo Internacional de Energía Atómica. (2018). *El OIEA en síntesis átomos para la paz y el desarrollo*. https://www.iaea.org/sites/default/files/19/01/iaeaataglace_sp.pdf

Fenech, M. & Morley, A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutation research*, 161(2), 193–198. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(86\)90010-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(86)90010-2)

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D., & Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125–132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>

Fisher, J. (1987). Guinness, Gosset, Fisher, and Small Samples. *Statist Science*, 2 (1), 45-52. <https://projecteuclid.org/euclid.ss/1177013437>

Galle, P. y Paulin, R. (2003). *Biofísica: radiobiología, radiopatología*. Masson.: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=88705>

García, O., Ramalho, A., Di Giorgio, M., Mir, S., Espinoza, M., Manzano, J., Nasazzi, N. & López, I. (1995). Intercomparison in cytogenetic dosimetry among five laboratories from Latin America. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 327 (1/2), 33-39. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002751079400066E>

García, V. (2019, 3 de noviembre). *Costa Rica tiene listo el único laboratorio de Centroamérica capaz de reaccionar ante emergencias radiológicas*. El país.cr. <https://www.elpais.cr/2019/11/03/costa-rica-tiene-listo-el-unico-laboratorio-de-centroamerica-capaz-de-reaccionar-ante-emergencias-radiologicas/>

Griffiths, D. (2017). *Introduction to Electrodynamics*. (4th. Ed). Cambridge University Press

Haug, E. & Nakel, W. (2004). *The Elementary Process of Bremsstrahlung*. World Scientific.

- Hebert, F. (1986). *Introduction to radiological physics and radiation dosimetry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <http://www-f9.ijs.si/~mm/Attix%20-%20Introduction%20to%20radiological%20physics%20and%20radiation%20dosimetry.pdf>
- International Atomic Energy Agency. (2004). *Practical radiation technical manual. Individual Monitoring*. <https://www.iaea.org/publications/6763/individual-monitoring>
- International Atomic Energy Agency. (2005) *Radiation oncology physics: a handbook for teachers and students*. International Atomic Energy Agency. https://www-pub.iaea.org/mtcd/publications/pdf/pub1196_web.pdf
- International Atomic Energy Agency. (2008). *Applied Statistics for Biological Dosimetry Part 1. Lecture Module 8*. [Presentación de diapositivas] https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:jYR3hHG-3nEJ:https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/EPR-Biodosimetry/Lectures/Module%25208_Part%25201_Applied%2520Statistics%2520for%2520Biological%2520Dosimetry.ppt+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=cr
- International Atomic Energy Agency. (2013). *Magnitudes y unidades de radiación*. https://rpop.iaea.org/RPOP/RPoP/Content-es/InformationFor/HealthProfessionals/1_Radiology/QuantitiesUnits.htm
- International Union of Pure and Applied Chemistry. (2014). *Radical (free radical)*. <http://goldbook.iupac.org/terms/view/R05066>
- Joiner, M. & Van der Kogel, A. (2009). *Basic Clinical Radiobiology*. (4th. Ed.). Edward Arnold. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.462.2846&rep=rep1&type=pdf>
- Kang, C., Yun, H., Kim, H. & Kim, C. (2016). Strong correlation among three biodosimetry techniques following exposures to ionizing radiation. *Genome Integrity*, 7 (11). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5292912/pdf/GI-7-11.pdf>
- Kelley, C. (1999). *Iterative methods for optimization*. https://archive.siam.org/books/textbooks/fr18_book.pdf

- Korea Institute of Radiological & Medical Sciences*. (2020?). <https://www.kirams.re.kr/eng/>
- Lind, D., Marchal, W. y Wathen, S. (2012). *Estadística aplicada a los negocios y la economía*. (15a ed.) McGraw-Hill.
<https://cape.fcfm.buap.mx/jdzf/cursos/est1/libros/book1e1.pdf>
- Ministerio de Salud. (2014?). *Informe de labores Lic. Adriana Salazar González*.
<https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos/sobre-el-ministerio/informes-de-gestion/jefaturas/3244-informe-de-labores-adriana-salazar-gonzalez-unidad-de-asuntos-internacionales-2014-2016/file>
- National Geographic. (2019). *Accidente nuclear. Las consecuencias de desastre nuclear de Chernóbil*. https://historia.nationalgeographic.com.es/a/consecuencias-desastre-nuclear-chernobil_10304/2
- National Human Genome Research Institute. (2020). *Hibridación fluorescente in situ (Fish)*.
<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Hibridacion-fluorescente-in-situ>
- National Institute of Standards and Tecnology. (2018). *Libro del Web de Química del NIST, SRD 69. NIST*. <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=9011-14-7>
- National Institute of Standards and Tecnology. (2019a). *X-Ray Mass Attenuation Coefficients Polymethyl Methacrylate*.
<https://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/ComTab/pmma.html>
- National Institute of Standards and Tecnology. (2019b). *X-Ray Mass Attenuation Coefficients. Water Liquid*.
<https://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/ComTab/water.html>
- Organismo Internacional de Energía Atómica, Organización Mundial de la Salud y Organización Panamericana de la Salud. (2010). *Protección radiológica relacionada con la exposición médica a la radiación ionizante. Guía de seguridad*. https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/Pub1117s_web.pdf
- Organismo Internacional de Energía Atómica. (1999). *Sobreexposición accidental de pacientes de radioterapia en San José (Costa Rica)*.
<https://www.iaea.org/es/publications/5763/sobreexposicion-accidental-de-pacientes-de-radioterapia-en-san-jose-costa-rica>

- Organización Internacional de Energía Atómica. (2005). *Determinación de la dosis absorbida en radioterapia con haces externos. Un código de Práctica Internacional para la dosimetría basada en patrones de dosis absorbida en agua*. https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TRS_398s_Web.pdf
- Organismo Internacional de Energía Atómica. (2014). *Dosimetría citogenética: Aplicaciones en materia de preparación y respuesta a las emergencias radiológicas*. https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/EPR_Biodosimetry_S_web.pdf
- Organismo Internacional de Energía Atómica. (2015). *El accidente de Fukushima Daiichi*. <https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/SupplementaryMaterials/P1710/Languages/Spanish.pdf>
- Organismo Internacional de Energía Atómica. (2016a). *Protección radiológica y seguridad de las fuentes de radiación: Normas básicas Internacionales de Seguridad. Requisitos de seguridad generales*. https://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/P1578_S_web.pdf
- Organismo Internacional de Energía Atómica. (2016b). *Protección radiológica y seguridad de las fuentes de radiación con fines de protección radiológica. Guías de seguridad, N° RS-G-1.8*. https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/Pub1216s_web.pdf
- Paz y Miño, C. y López-Cortés, A. (2014). *Genética molecular y citogenética humana. Fundamentos, aplicaciones e investigaciones en Ecuador*. Yachayep.
- PTW-Freiburg. (2009). *User manual water phantom T41023*. https://ccap.hep.ph.ic.ac.uk/trac/raw-attachment/wiki/Research/Instrumentation/Documentation/Drawings/Water_phantom_T41023_Man_en_73813100_02.pdf
- Scherlach, K., Boettger, D., Remmea, N. & Hertweck, Ch. (2010). The chemistry and biology of cytochalasans. *Natural Product Reports*, 27(6), 869–886. <https://doi.org/10.1039/b903913a>
- Soriano del Castillo, J. y Montoro, A. (2013). *Último avances en radioprotectores de origen natural*.

https://www.researchgate.net/publication/262724919_Ultimos_avances_en_radioprotectores_de_origen_natural

Thomas, G. & Morgan, M. (2006). Enola Gay. *The bombing of Hiroshima*. Konecky & Konecky https://archive.org/details/isbn_9781568525976/page/n1/mode/2up

United States Nuclear Regulatory Commission. (1983). *Aviso Informativo No. 83-66, Suplemento 1: Muerte en instalación crítica Argentina*. <https://www.nrc.gov/reading-rm/doc-collections/gen-comm/info-notices/1983/in83066s1.html>

Universidad de Costa Rica. (2020). *Directorio*. <https://www.ucr.ac.cr/directorio/escuela-de-fisica.html>

Varga, D., Johannes, T., Jainta, S., Schuster, S., Schwarz-Boeger, U., Kiechle, M., Patino, B. & Vogel, W. (2004). An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis. *Mutagenesis*, 19 (5), 391-397. https://www.researchgate.net/publication/8326043_An_automated_scoring_procedure_for_the_micronucleus_test_by_image_analysis

Volterrani, D., Erba, P., Carrio, I., Strauss, H. & Mariani. (Eds). (2019). *Nuclear Medicine Textbook*. Springer. <https://www.springer.com/gp/book/9783319955636>

Zalacain, M., Sierrasesúмага, L. y Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28 (2), 227-236. <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v28n2/revision2.pdf>

Anexo 1

Manual del fantoma T41023

User Manual

Water Phantom

T41023



Contents

Operating Manual	<input checked="" type="checkbox"/>
Technical Manual	<input checked="" type="checkbox"/>
Service Manual	<input checked="" type="checkbox"/>

General Information

- The product bears the CE-mark "CE" in accordance with the Council Directive 93/42/EEC about Medical Devices and fulfills the essential requirements of Annex I of this directive.
The product is a class I device without measuring function (MDD).
- The user manual is an integral part of the product. It should always be kept near the product. Observance of the manual is a prerequisite for proper product performance and correct operation.
- Operator safety, specified measuring accuracy and interference-free operation can be guaranteed only if original products and parts are used. Furthermore only the accessories listed in this manual are approved by PTW-Freiburg and may be used in conjunction with the product, or else accessories whose use has been expressly permitted by PTW-Freiburg. Safe operation and proper product performance are not guaranteed if accessories or consumables from other manufacturers are used.
- PTW-Freiburg cannot be held liable for damages resulting from the use of accessories, consumables from other manufacturers or when the user ignores the instructions and information given in this manual.
- The warranty period is 1 (one) year and begins on the day of delivery.
It is unaffected by repairs covered by the warranty regulations.
- PTW-Freiburg considers itself responsible for safety, reliability and performance of the product only, if assembly, extension, readjustment, modification or repair is carried out by PTW-Freiburg or by persons authorized by PTW-Freiburg, and if the product is used in compliance with the technical documentation.
- In case of any questions concerning service, support or warranty please contact your supplier.
- This manual is in conformity with the product specifications and all applicable safety standards valid at printing date. All rights are reserved for devices, circuits, techniques, software and names referred to in the manual.
- No part of the technical documentation may be reproduced without written permission from PTW-Freiburg.
- PTW-Freiburg is registered manufacturer according to the ElektroG (Elektro- und Elektronikgeräte-Gesetz).
Elektro-Altgeräte-Register (EAR) Registration number DE15599992
- PTW-Freiburg works in strict accordance with a quality management system which is continuously updated according to national and international standards.

PTW-FREIBURG

Physikalisch-Technische Werkstätten

Dr. Pychlau GmbH

Lörracher Str. 7

79115 FREIBURG

GERMANY

Phone: +49 761 49055-0

Fax: +49 761 49055-70

info@ptw.de

www.ptw.de

Contents

General Information	2
Contents	3
Illustrations	4
Intended Use	5
Safety Information	5

Operating Manual **9**

1 Description of the Water Phantom	9
2 Performing a Measurement	11
2.1 Notes	11
2.2 Assembly	11
2.3 Hints for use with Parallel Plate Chambers and TLD Probes	14

Technical Manual **15**

3 Technical Specifications	15
4 Accessories	16

Service Manual **17**

5 Cleaning	17
6 Preventive Maintenance	18
7 Disposal of the Product	18
Literature	19
Index	19

Illustrations

Figure 1:	Definition of patient environment	8
Figure 2:	View of the phantom type 41023 with a chamber holder and a chamber	10
Figure 3:	Mounting chamber holder	12
Figure 4:	Assembling the parallel plate chamber into the adaptor	13

Intended Use

The water phantom type 41023 has been designed for calibration measurements in radiation therapy using a horizontal beam. For this purpose up to 3 ionization chambers and / or TLD probes can be placed at different water depths.

Safety Information



This is the safety alert symbol. It is used to alert the user to potential hazards. Obey all safety messages that follow this symbol to avoid possible bodily injury or equipment damage.

All safety messages consist of the following components:

- Safety alert symbol and signal word
- Type of danger
- Source of danger
- Consequence
- Measures to prevent hazard

Signal Words

DANGER

Indicates an imminent hazard. If not avoided, the hazard will result in death or serious injury.

WARNING

Indicates a hazard. If not avoided, the hazard can result in death or serious injury.

CAUTION

Indicates a potential hazard. If not avoided, the hazard could result in minor injury or product / property damage.

NOTE

Provides useful information to assure that you get the most from your equipment.

Safety Information**⚠ DANGER**

Operation in areas where an explosion hazard may occur or in oxygen-enriched atmospheres

Explosion Hazard!

The product is not suitable for operation in areas of risk where an **explosion hazard** may occur. Explosion hazards may be caused by the use of combustible anaesthetics, skin-cleansing agents and disinfectants.

Furthermore the product is not suitable for application in **oxygen-enriched atmospheres**. The atmosphere is considered to be oxygen-enriched when more than 25 % of oxygen or nitrous oxide is added to the ambient air.

⚠ WARNING

Improper handling.

Patient Hazard!

The product is a medical electrical device and must only be handled by persons who are trained in the use of such equipment and are capable of applying it properly. The operator must be trained in the use of the device.

Exclusion of operation in the patient environment: Neither the product nor any peripheral devices may be operated in the patient environment (refer to Figure 1).

Exclusion of operation as device with patient contact: The device is not intended for use in direct contact with the patient. Neither the device nor any peripheral device may have contact to the patient.

Never touch the patient and open connectors of the device at the same time.

Exclusion of operation as controlling instrument: The device is only designed for use as a measuring device. The device must not be used to control radiodiagnostic equipment or radiotherapy units.

⚠ WARNING

Hazards originating from other system components.

Patient Hazard! Equipment Damage!

Observe the safety information provided in the user manuals of the system components.

⚠ WARNING

Electricity is a source of risk, particularly when the product is not in perfect operating condition or when it is operated inappropriately.

Shock Hazard!

Strictly observe the following warnings. Failure to do so may endanger the lives of the patient, the user and other persons involved.

Use of peripheral devices: Devices may be connected to other devices or to parts of systems only if it has been ascertained that this connection does not impair the safety of the patient, the operator or the environment.

If the device specifications do not contain information as to connecting the device to other equipment, you must consult the manufacturer of the other equipment or an expert about the effects of the connection on the patient, the operator or the environment.

⚠ CAUTION

Use of the product without observing the user manual.

Bodily Injury! Equipment Damage!

Always use the product in compliance with the user manual. Otherwise the intended protection can be reduced.

⚠ CAUTION

Operation under inadequate ambient conditions.

Equipment Damage!

Always observe the ambient conditions as indicated in the `Technical Specifications`.

⚠ WARNING

Packaging material is a source of risk.

Suffocation Hazard!

Dispose of the packaging material, observing the applicable waste-control regulations. Keep the packaging material out of children's reach.

⚠ WARNING

Confusion of chemicals.

Risk of Poisoning!

Chemicals required for application or maintenance of the device, for instance, must under all circumstances be stored, prepared, and kept at hand in their specific containers. Failure to observe this instruction may result in severe consequences.

NOTE

Please observe the user manuals of all connected devices!

NOTE



This symbol means:
Refer to user manual.



This symbol means:
Separate collection for electrical and electronic equipment!
(refer also to section Disposal of the Product)



This symbol means:
The product bears the CE-mark.

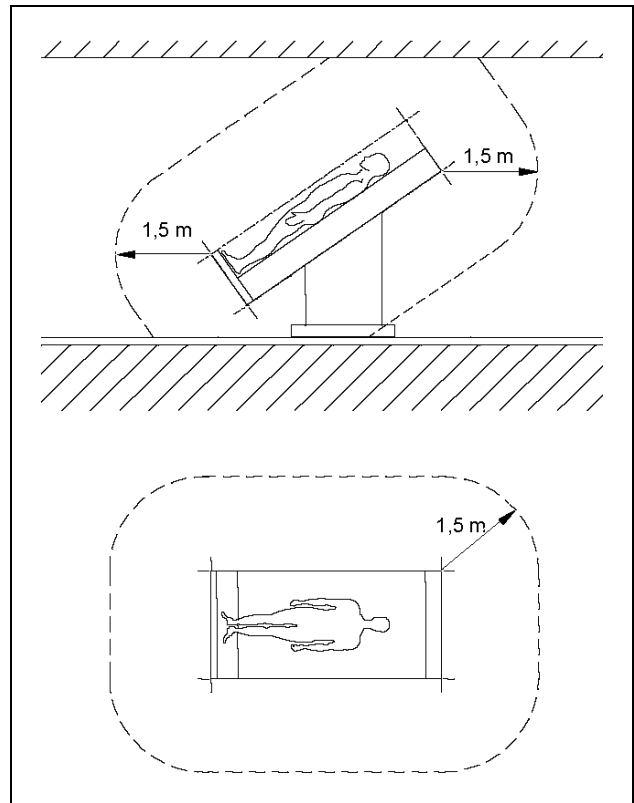


Figure 1: Definition of patient environment

Operating Manual

1 Description of the Water Phantom

The water phantom type 41023 - according to ICRU Report No 48 and the PTB report, volume 16 (PTB Braunschweig is the German Federal Institute of Physics and Metrology) - consists of a tank with 4 walls and a base plate of 10 mm acrylic (PMMA) which is filled with water. The outer dimensions are approximately 300 mm x 300 mm x 300 mm.

One wall has an entrance window of 17 cm x 17 cm and 3,05 mm thickness (corresponding to 3,5 mm H₂O).

The phantom is supplied with a precision holding device for the exact location of detectors. On top of the tank there is a bridge with holes into which acrylic adaptors for different detectors can be inserted, avoiding air gaps between chamber wall and adaptor. The adaptor position can be varied using a spindle drive adjustable to 0.1 mm precision. The measuring depth is continuously variable between 6 mm and 260 mm (parallel plane chambers and TLD probes) respectively between 14 mm and 264 mm (compact chambers).

The bridge allows the simultaneous use of up to three adaptors for comparison measurements in a maximal lateral distance of 60 mm.

The phantom is supplied with handles, adjustable stands and a drain tap. The maximum water content is 17.6 liter. The total weight without water is 9 kg.

CAUTION

Improper handling.

Equipment damage!

The water phantom type 41023 may only be filled with water continuously for 8 hours maximum in order to avoid a damage of the tank due to the hygroscopic character of PMMA.

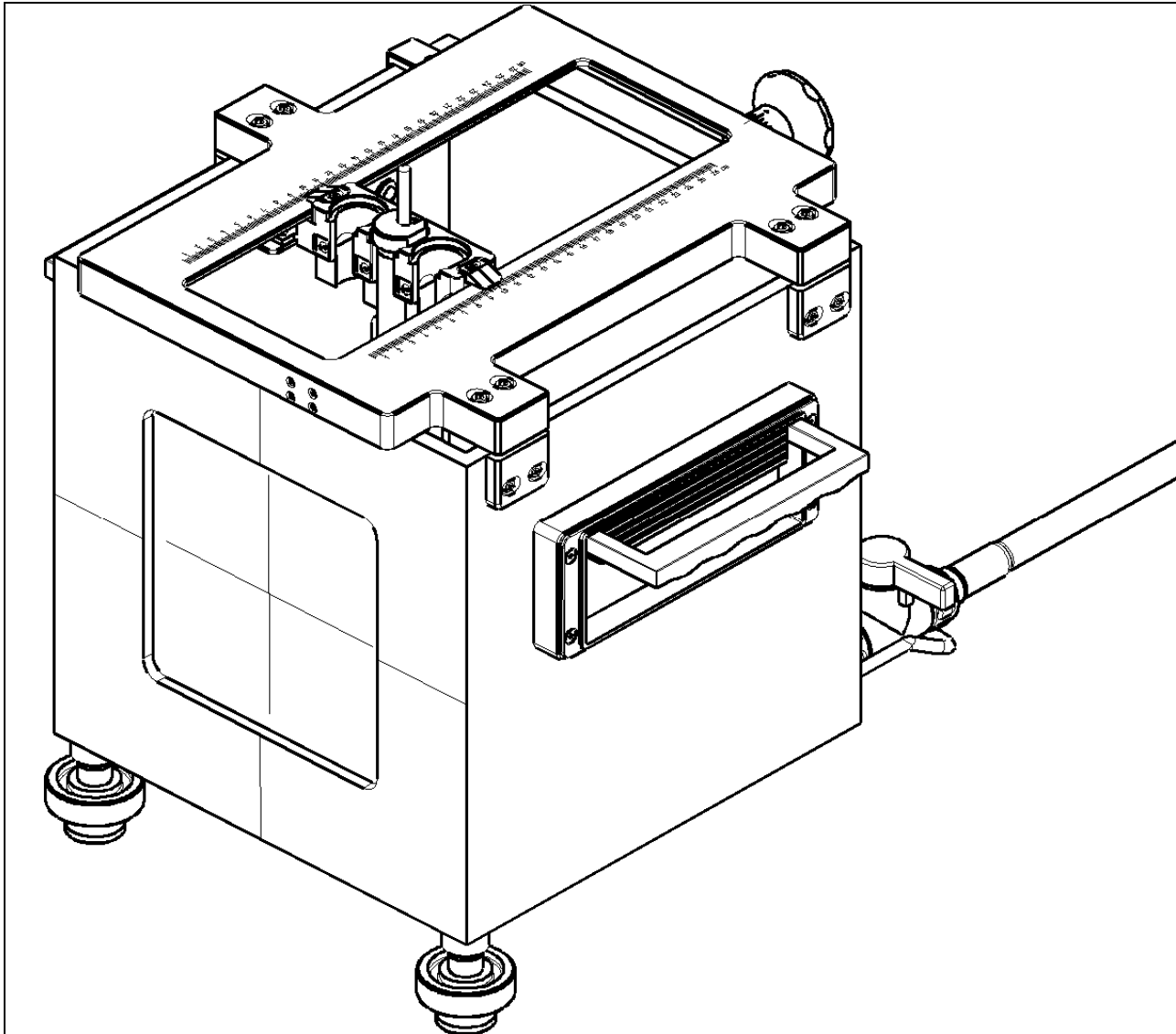


Figure 2: View of the phantom type 41023 with a chamber holder and a chamber

2 Performing a Measurement

2.1 Notes

The water phantom type 41023 can be used for simultaneous measurements with up to three chambers. When using more than one chamber, due to possible field inhomogeneities the chambers should be exchanged in their position to obtain equivalent doses for each chamber in each position.

When using chambers of different construction at the same time, the possibility of a mutual influencing of the radiation field should be considered; this is not necessary when comparing two chambers of the same construction since mutual influences then are equivalent.

NOTE

Different scattering due to different chamber construction could be investigated, for instance, by calibrating the chambers versus a monitor transmission chamber.

If irradiating several chambers the necessary field size should be observed.

NOTE

Especially with chambers and adaptors with recesses (e.g. Roos chamber) the user must make sure that no bubbles remain in the recesses.

NOTE

Please observe the user manuals of all used detectors!

2.2 Assembly

Mounting the phantom

The phantom type 41023 is used for calibration measurements in a horizontal beam. The horizontal alignment of the phantom can be adjusted using the three adjustable leveling supports. The alignment can be checked using the crosshairs with the half filled phantom like a spirit level.

Before the first usage of the water phantom the three adjustable stands must be screwed into the bottom of the phantom.

To avoid impurities the phantom is best used with distilled water. This should be boiled to minimize the air content and cooled before use. Do not store the phantom filled with water for any length of time (max. 8 h).

To ensure temperature equilibrium with the surroundings, the phantom should be set up several hours before measurements. In case of changing ambient temperature the temperature in the water phantom should be continuously monitored.

The phantom must be positioned with its entrance window towards the radiation source.

The positioning scale shows in which water equivalent depth the reference point of the detector is positioned. The depth is measured from the outside of the beam entrance window. The design of the scale considers density and thickness of the material from entrance window and detector holder. For parallel plate chambers also the detector material in front of the reference point is considered. The reference point is for compact chambers (thimble chambers) the chamber axis and for parallel plate chambers the inside of the entrance window. For TL or alanine detectors the reference point is the front edge or the center of the detector material. For their precise positioning you have to use the container marked with "front" (reference point in front edge) or "center pos" (reference point in center).

The thickness of the PMMA holders for compact chambers is 0.87 mm in front of the measuring volume (corresponding to 1 mm water).

The calibration factor given from PTW for a compact chamber refers to the usage of these holders.

Observe the following hints for positioning the detectors with the effective point of measurement instead of the reference point to a specified depth.

For thimble chambers: The effective point of measurement is displaced about the half radius of the measuring volume towards the radiation source. The chamber has to be shifted about $\frac{1}{2} r$ of the measuring volume to a higher depth.

For parallel plate chambers: The reference point and the effective point of measurement are same.

Mounting the adaptors

NOTE

When assembling the chamber adaptor, the user must make sure that the parts are put together to a tight fit.

Adaptors for compact chambers are inserted from above into the receiving holes of the bridge so that the flat side of the upper ring corresponds to the flat side of the receiving hole.

Adaptors for parallel plate chambers are rotated by 90° around the vertical axis and inserted from the front side into the reception bridge then rotated again to bring the flat side of the upper ring over the corresponding flat side of the reception hole and pushed down into the measuring position until locking with an audible click (see figure 2).

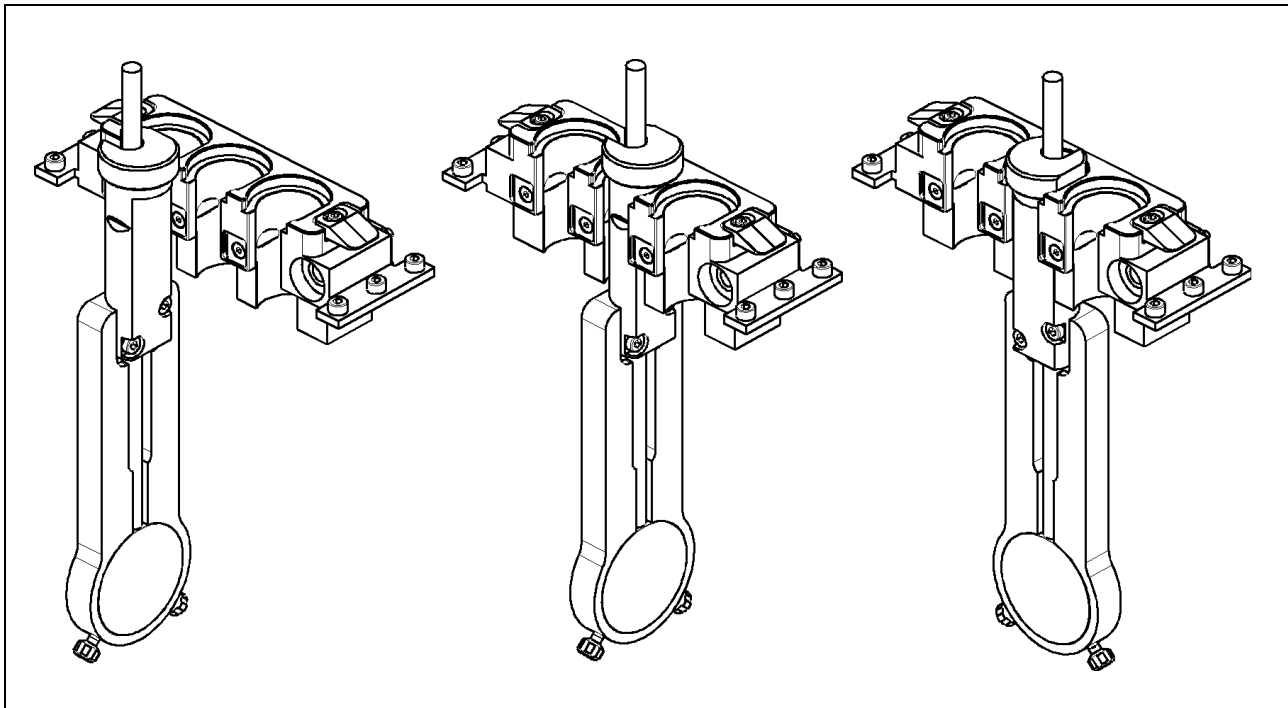


Figure 3: Mounting chamber holder

Mounting the chambers

To insert parallel plate chambers into the adaptor without damaging the cable the chamber is pushed through the adaptor slot (see figure 3) and fixed with the focus side to the front in the reception hole of the adapter using the two screws. The cable is lead up through the slot in the chamber adapter stem.

If using different adaptors it must be kept in mind that not all adaptors are watertight; the Markus chamber and the Advanced Markus chamber must be used with its watertight build-up cap.

NOTE

Especially with chambers and adaptors with recesses (e.g. Roos chamber) the user must make sure that no bubbles remain in the recesses.

The drain tap can be used for a complete emptying of the phantom.

NOTE

If the phantom is packed for transport the feet in the ground plate must be unscrewed before packing.

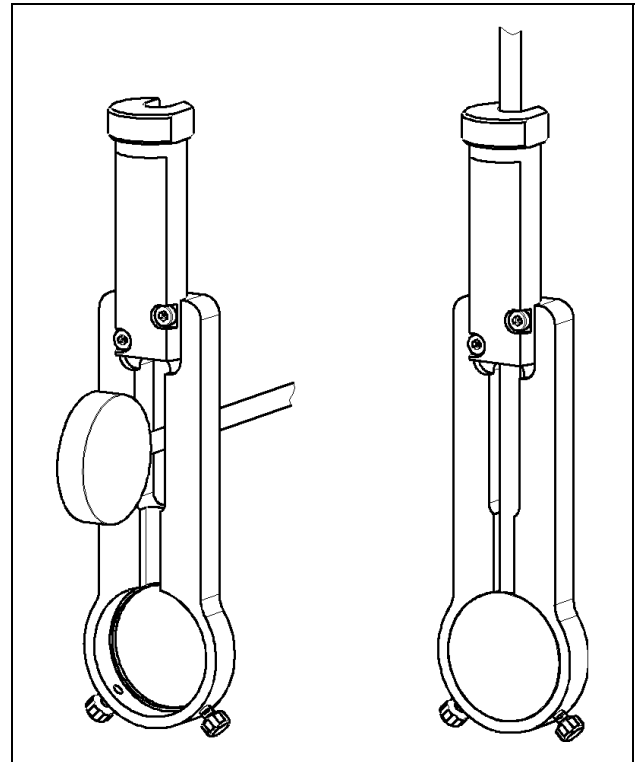


Figure 4: Assembling the parallel plate chamber into the adaptor

2.3 Hints for use with Parallel Plate Chambers and TLD Probes

When assembling the chamber adaptors, especially when assembling the adaptors for parallel plate chambers or TLD containers, the user must make sure that the parts are put together to a tight fit.

Parallel plate chambers and TLD containers can be shifted to the effective point of measurement of different thimble chambers with the help of spacers (included). In this assembly first insert the spacer ring then insert the parallel plate chamber or the TLD container with the open side (back side) first so that in assembled state the chamber is slightly displaced towards the entrance window.

Observe the reference point of the used TLD container; mark “Front Pos” or “Center Pos”.

Technical Manual

3 Technical Specifications

Only values with specified tolerances or limits are guaranteed. Values without tolerances are for information only.

Device designation	Water Phantom Type 41023
Manufacturer	PTW-Freiburg
Intended Use	Calibration measurements in horizontal therapy beams
Operating mode	continuous operation
Material	Tank, Holder and Adaptors: PMMA Bridge and rails: Al Worm drive: stainless steel
Outer Dimensions	300 mm x 300 mm x 300 mm
Wall Thickness	10 mm
Entrance Window	170 mm x 170 mm x 3.05 mm (according to 3.5 mm water thickness)
Minimum Measuring Depth	6 mm (Parallel plane chambers and TLD probes) 14 mm (PTW Farmer chambers) 13 mm (other PTW Compact chambers)
Maximum Measuring Depth	260 mm (Parallel plane chambers and TLD probes) 264 mm (Compact chambers)
Depth increments	Continuously adjustable to 0.1 mm
Volume	17.6 l
Weight	Approx. 9 kg without water filling

Environmental conditions for operation	
Temperature	(+10 ... +40) °C
Rel. humidity	(10 ... 85) %, no condensation (max. 20 g/m ³ absolute humidity)
Atmospheric pressure	(600 ... 1200) hPa
Environmental conditions for transport and storage	
Temperature	(-20 ... +60) °C
Rel. humidity	(10 ... 85) %, no condensation (max. 20 g/m ³ absolute humidity)
Atmospheric pressure	(600 ... 1200) hPa

4 Accessories

Detectors, Adapters, holder and container are available on request from PTW-Freiburg.

Service Manual

WARNING

Improper execution of service tasks.

Hazards to Persons! Equipment Damage!

The following service tasks must only be performed by specially trained staff.

Further service tasks may only be carried out by PTW-Freiburg or by persons authorized by PTW-Freiburg.

5 Cleaning

Surface of phantom and adaptors

CAUTION

Disinfection of the surface with disinfectants on a phenol base or peroxide compounds.

Equipment Damage!

Do **not** use disinfectants on a phenol base or peroxide compounds to disinfect the surface.

Rub the devices down with a dry or slightly moist cloth. For this purpose use soap water. The devices cannot be sterilized or disinfected.

Due to its surface geometry, the product cannot be thoroughly disinfected. Furthermore, the product cannot be sterilized.

Perspex Tank

- First of all, the Perspex tank is drained. Therefore connect the water hose to the drain plug at the Perspex tank. Place the open end into a water receptacle.
- Open the drain plug to empty the Perspex tank.

The inclination required to completely drain the Perspex tank can be attained by adjusting one of the adjustable legs accordingly. Do not tilt the tank manually.

The bridge is adjusted by PTW-Freiburg. Do not remove it.

For cleaning, use a mild cleaning agent suitable for plastic material or soap water.

After cleaning, thoroughly remove all remains of the cleaning agent.

You should coat the Perspex tank for storage with a cover.

NOTE

For cleaning the detectors, please observe the indications in the corresponding user manuals.

6 Preventive Maintenance

Check before each use

Before each use, visually inspect the device and the cables for signs of mechanical damage.

Also, conduct a constancy check.

If damages or malfunctions are identified, the device must be repaired before it is used again.

The product does not require any other, regular maintenance measures.

7 Disposal of the Product

The typical lifetime of the product is about 10 years.

At the end of the product life the components must be disposed of in compliance with the applicable waste control regulations. The different materials must be separated and recycled as appropriate.

The product does not contain hazardous materials.

The cost for a potential return at the end of the product life time is to be borne by the customer.

Literature

- [1] Council Directive 93/42/EEC concerning medical devices
(Medical Device Directive - MDD)
- [2] IEC 60601-1-2
Medical electrical equipment
Part 1: General requirements for safety;
2nd Collateral Standard: Electromagnetic compatibility - Re-
quirements and tests
- [3] IEC/CISPR 11
Industrial, scientific and medical (ISM) radio-frequency
equipment - Radio disturbance characteristics - Limits and
methods of measurement.
- [4] IEC 61140
Protection against electric shock -
Common aspects for installation and equipment
- [5] IEC 60950-1
Information technology equipment - Safety
Part 1: General requirements
- [6] IEC 60601-1
Medical electrical equipment –
Part 1: General requirements for basic safety and essential
performance
- [7] IEC 60601-1-1
Medical electrical equipment
Part 1: General requirements for safety;
1st Collateral Standard: Safety requirements for medical elec-
trical systems

Index

	C	
Cleaning		17
	D	
Disposal		18
	G	
General information		2
	I	
Illustrations		4
Intended use		5
	L	
Literature		19
	M	
Maintenance		18
Monitor transmission chamber.....		11
	S	
Safety information.....		5
	T	
Technical specifications.....		15
	U	
Use with Parallel Plate chambers		14
Use with TLD Probes.....		14

Anexo 2

Consentimiento informado

Consentimiento informado para que el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) utilice las muestras preparadas de mis linfocitos y los datos obtenidos de mi Tesis titulada “Generación de una curva preliminar de efecto biológico en función de la dosis absorbida, mediante la irradiación de muestras de sangre periférica en un maniquí de agua con una fuente radiactiva de Cobalto-60, utilizando el ensayo de micronúcleos”.

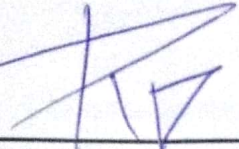
Voluntariamente trabajé con mis propias muestras de sangre, donante masculino, adulto y sano, así como las muestras de sangre de una donante femenina, adulta y sana. Esta sangre tuvo valor reactivo y no se realizaron estudios genéticos ni de otro tipo, más que el necesario para la estadística y curva de efecto biológico.

La sangre la utilicé exclusivamente para la irradiación in vitro a nueve puntos de dosis con el objetivo de elaborar la curva de dosis-efecto en rayos gamma para micronúcleos. Las muestras de sangre de ambos donantes se anonimizaron y se codificaron según el punto de dosis a irradiar.

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

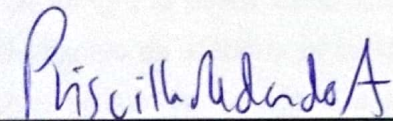
De manera voluntaria, yo, Rónald Carrillo Paniagua, mayor de edad, con cédula de identidad 7 0175 0583, cedo al Instituto de Investigaciones en Salud de la Universidad de Costa Rica, las muestras preparadas de linfocitos en láminas y los datos que surgieron a partir de este estudio para que se complemente con la información de otros donantes en

estudios futuros pertinentes a la curva de calibración de micronúcleos para rayos gamma.

X 

Rónald Carrillo Paniagua

Yo, Priscilla María Redondo Arias, mayor de edad, con cédula de identidad 1 1386 0958, de manera voluntaria y con plena posesión de mis facultades mentales, consciente y voluntariamente acepto que se utilicen las mediciones obtenidas a partir de las muestras de sangre irradiadas (como valor reactivo), para la estadística y curva de efecto biológico realizada en este proyecto.

X 

Priscilla María Redondo Arias

Anexo 3

Protocolo de siembra y cosecha celular

Se presenta a continuación un protocolo estándar simple que da buen resultado. Existen otros métodos, con pasos más procedimentales y que cultivos de linfocitos aislados II pero a efectos de la dosimetría biológica sistemática bastan los cultivos de sangre entera

IV-I. PROTOCOLO ESTÁNDAR PARA LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS CON BLOQUEO DE LA CITOCINESIS

- 1) La muestra de sangre se extrae con un anticoagulante de heparina de litio.
- 2) Por regla general se agregan 0.5 ml, de sangre entera a 4,5 ml. de medio de cultivo (RPMI-1640) enriquecido con 10 a 15 % de suero de ternera fetal termoinactivado, L-glutamina y antibióticos. Se agregan al cultivo 100 PL de fitohemaglutinina (por ejemplo, PHA-M, Sigma, 25 mg/25 ml. 1--120), obteniéndose una concentración final de 20 pg/mL.
- 3) Se cultiva la sangre en frascos de cultivo tisular a 37 °C, 5 % CO₂ en atmósfera humidificada.
- 4) A las 24 horas de la estimulación con PHA se agregan al cultivo 20 PL de citocalasina B (Cyt-B), obteniéndose una concentración final de 6 pg/mL. Se trata de la concentración óptima para acumular células BN en cultivos de sangre entera. Dado que la Cyt-B se disuelve mal en una solución acuosa, hay que preparar una solución madre de Cyt-B en dimetil sulfóxido (5 mg Cyt-B en 3,3 ml. de DMSO), separarla en fracciones y conservarla a -20 °C hasta su uso.
- 5) El cultivo llega a término a las 68—72 horas después de la estimulación con PHA. El momento de la cosecha elegido debe maximizar el número de células BN obtenidas, reduciendo al mínimo el de células mononucleadas o multinucleadas.

- 6) Se centrifugan suavemente las células a 180 g durante 10 min y se elimina el medio de cultivo sobrenadante.
- 7) Se someten las células a tratamiento hipotónico con 7 mL de KCl 0,075M frío (4 °C) para lisar los hematíes y se centrifuga inmediatamente a 180 g durante 10 min.
- 8) Se elimina el sobrenadante, que se sustituye por 5 mL de fijador recién preparado con metanol: ácido acético (10:1) diluido 1:1 con solución de Ringer (4,5 g NaCl, 1 g KCl, 0,12 g CaCl₂ en 500 mL H₂O). Hay que agregar el fijador agitando las células para impedir que se formen grumos. Seguidamente, se centrifugan las células de nuevo a 180 g durante 10 min.
- 9) Las células se lavan dos o tres veces con fijador recién preparado a base de metanol: ácido acético (10:1), esta vez sin solución de Ringer, renovando el fijador cada vez— hasta que la suspensión de células está clara.
- 10) Seguidamente, se retira el sobrenadante hasta 1 cm o menos por encima del sedimento de células (en función del tamaño del sedimento), se resuspenden las células delicadamente. y se vierte la suspensión gota a gota sobre portaobjetos limpios, que se dejan secar al aire.
- 11) Para análisis al microscopio óptico, las células se pueden teñir con Giemsa al 2—6 % (por ejemplo, solución de Giemsa de azur-eosina-azul de metileno. de Merck) en tampón HEPES (0,03M ; pH 6,5) durante 10—20 min a oscuras, seguido de un rápido aclarado en agua destilada y secado al aire. O bien, para microscopia de fluorescencia, las células se pueden teñir con naranja de acridina (10 µg/mL en solución salina tamponada con fosfato a pH 6,9) durante 2—3 segundos.

Anexo 4

Manual Dose Estimate

Dose Estimate

Version 4.0

Cytogenetics Dose Estimation Software

Created by Liz Ainsbury

Health Protection Agency
Centre for Radiation,
Chemical and Environmental Hazards,
Chilton,
Didcot,
Oxon OX11 0RQ

Last updated: 17th May 2010

Contents

1	Introduction	ii
2	Dose estimation from chromosome aberrations	ii
2.1	Aberration dose estimation	ii
2.2	Testing for adherence to the Poisson distribution	iv
2.3	Fractionated and protracted exposures	iv
2.4	Cases where a suspected dose is available	v
2.5	Saving the results - the case report	vi
3	Isotropic sources	vii
4	Criticality - combined neutron and gamma exposures	viii
5	Partial body exposures	ix
5.1	The 'Qdr' method	ix
5.2	The 'Contaminated Poisson' method	ix
6	Yield curve fitting	x
7	Translocation analysis	xiv
8	Other statistics	xvi
8.1	Chi squared test for homogeneity	xvi
8.2	Chi squared test with one degree of freedom	xvii
8.3	T-test for significance of difference between two Poisson counts	xviii
9	Further notes	xix

1 Introduction

Dose Estimate is cytogenetics dose estimation software based on programs written by Alan Edwards, David Papworth and others. The software is written in Borland Delphi ®6. The software is divided into seven tools, which allow the user to carry out various tasks, described in detail in individual sections of this guide. The tools are:

1. Aberration Dose Estimate
2. Simple Isotropic Dose
3. Criticality
4. Partial Body Exposure
5. Yield Curve Fitting
6. Translocation Analysis (FISH)
7. Other Statistics

These are navigated by the ‘Options’ menu at the top of each page. The first five calculators allow dose estimation in a number of different situations common to cytogenetics. Number 2, ‘Isotropic dose,’ is included as a simple estimation tool. The yield curve fitting page allows calculation of yield curves coefficients from cytogenetic data, and also includes calculations of variance to mean ratio and the u-test statistic from aberration distribution. The Translocation Analysis tool allows the user to calculate Genome Equivalents for FISH. The final page, ‘Other Statistics,’ includes some of the more common statistical methods used in cytogenetics analysis. The following chapters detail the methods and calculations that each tool provides.

2 Dose estimation from chromosome aberrations

2.1 Aberration dose estimation

One of the most common methods of dose estimation involves using a predetermined calibration curve to relate a measured chromosome aberration yield to dose. On running the software, the user is presented with the opening screen: ‘Aberration Dose Estimate,’ as illustrated by figure 1. This page allows the estimation of dose based on the number of chromosome aberrations (e.g. dicentric, micronuclei) from the number of cells scored.

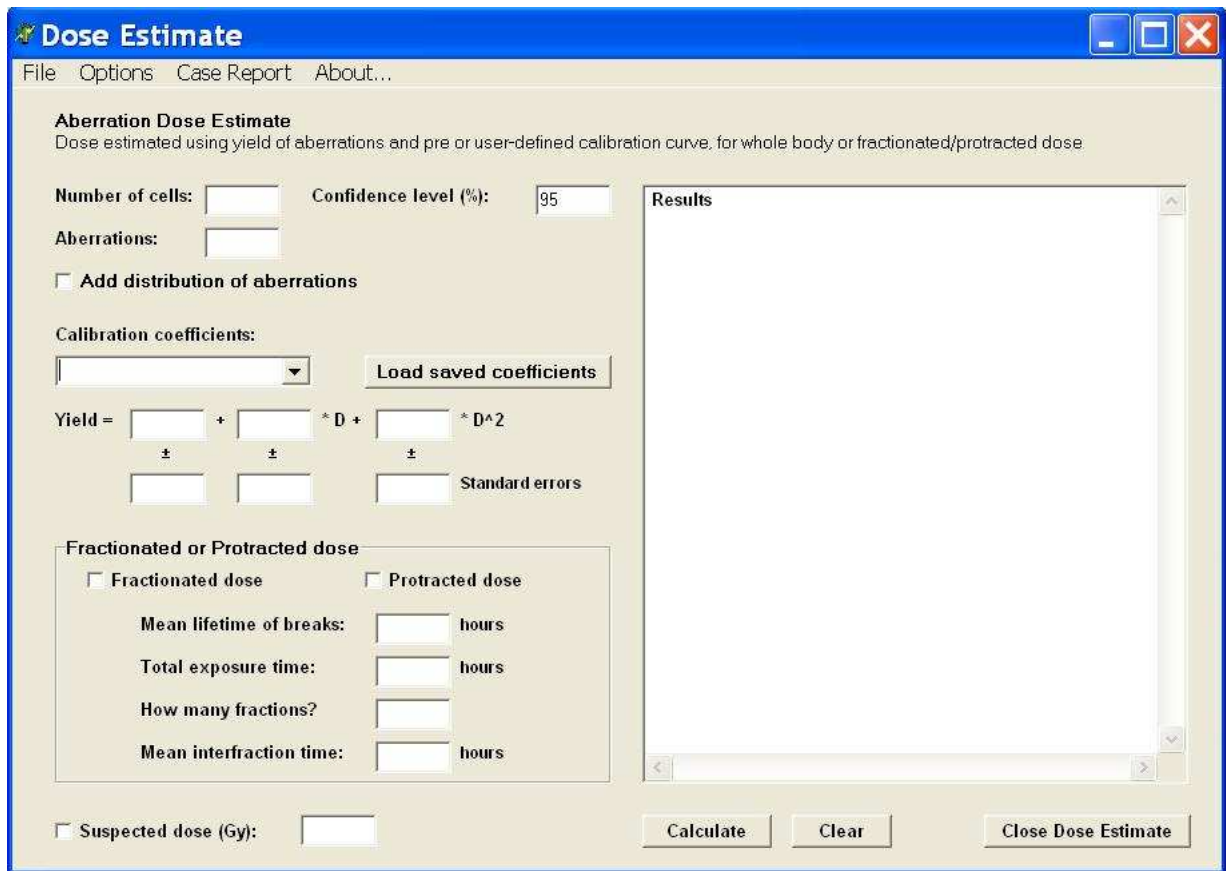


Figure 1: Dose estimation from chromosome aberrations, the front page of Dose Estimate

The user is presented with input boxes for numbers of cells, N , the number of aberrations (dicentric, micronuclei) and the required confidence limit (initially set to 95%). The values of these must be entered into the appropriate boxes.

A drop down box allows the user to select calibration coefficients from a list of predefined calibration curves. Initially, the dropdown box is empty - section 6 contains details of how to fit and save calibration curves. Calibration coefficients and their standard errors may also be manually entered. If values of standard errors are unknown, the '0' may be entered into each of these boxes.

On clicking the 'Calculate' button, the values of dicentric yield and standard error on this value are calculated and displayed in the text box marked 'Results' on the right hand side of the screen, as shown in figure 2.

The dose calculation is performed using the linear-quadratic relation:

$$y = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (1)$$

where y = yield, D is dose and α , β , C are calibration coefficients.

If the errors on the yield curve have been provided by the user, the standard error in the dose is calculated using method A described in IAEA (2001) [1]. The confidence limits on the number of dicentric are calculated using the exact Poisson method. In order to account for the error in the yield curve, a second set of confidence limits are calculated using the assumption of normal

distribution:

$$\text{Upper or lower limit} = D \pm 1.96 \times SE_D \quad (2)$$

where SE_D is the standard error in the dose.

In the ‘Results’ box, the first set of confidence limits given are from the Poisson error on the yield of dicentrics. The second set are the normal approximation, which take account of the calculated error on the calibration curve. Note that negative values, such as lower confidence limits, should be taken as 0.

In addition, the ‘Minimum resolvable dose’ is given, which is calculated based on the lowest number of dicentrics for which the lower 95% confidence limit is greater than zero.

2.2 Testing for adherence to the Poisson distribution

If desired, the distribution of aberrations may be added by selecting the ‘Add distribution of aberrations’ selection box. On pressing the ‘Calculate’ button, a series of enquiry boxes appear, asking the user to enter the distribution information: The maximum number of aberrations in any 1 cell, and the numbers of cells with aberrations up to this maximum. The variance/mean ratio and the u-test statistic, ‘u’, are then calculated to give an indication of the adherence of the aberrations to Poisson distribution, as described in [2]. In the case of overdispersion, the calculated standard errors and confidence limits are increased to account for the lack of adherence to the Poisson distribution [3].

2.3 Fractionated and protracted exposures

Protracted or fractionated exposures can result in reduced numbers of chromosome aberrations observed in a sample. Lea and Catcheside (1942) [4] proposed that in cases where a dose has been protracted or fractionated, the quadratic term calibration curve should be modified with a factor G , resulting in the modified yield equation:

$$y = C + \alpha D + \beta G D^2 \quad (3)$$

where $G = \frac{2}{x^2}(x - 1 + e^{-x})$ and $x = t/t_0$.

In practice, actual exposure must be approximated to either a continuous exposure at constant dose rate or to a number of fractionated acute exposures. In order to carry out the modified calculations, the user must select either the ‘Fractionated dose’ or ‘Protracted dose’ options by clicking in the appropriate box on the ‘Fractionated or Protracted dose’ panel - the method is selected when a tick appears in the box. For protracted dose calculations, the user must enter the values of mean lifetime of breaks, t_0 , normally 2 hours [5] [6] and the total exposure time, t . For fractionated exposure dose estimation, the number of fractions and the mean time between fractions must also be entered into the boxes on the panel.

Dose Estimate then calculates dose according to exposure time per fraction (as described in [1]): For brief intermittent exposures (≤ 15 minutes), with mean time between fractions of 6 or more hours, the exposure time is considered additive. For shorter interaction times, G is replaced with $\exp\frac{-t_1}{t_0}$, where t_1 is the time between fractions.

The results are displayed in the ‘Results’ box, as before, with the G correction applied to the quadratic term of the calibration curve.

2.4 Cases where a suspected dose is available

In some instances of suspected or actual overexposure, information is available regarding the physical dose, badge dose, or a calculated dose based on time of exposure and distance from a source. In this situation, the likelihood of an overexposure may be assessed by considering the relative probabilities of observing zero dose, mean calculated dose, or the recorded suspected dose. The ratios of probabilities of finding the observed number of aberrations for each of these doses, provide a quantitative illustration of how likely it is that the dose is real [3].

To implement the calculation of the odds ratios for zero dose:suspected dose, zero dose:mean dose and mean dose:suspected dose, the ‘Suspected Dose’ tick box should be selected, and the suspected dose (in Gy) entered into the text box at the bottom of the screen, in the format ‘0.25’.

On clicking the ‘Calculate’ button, the results, including the odds ratios described above, are presented in the ‘Results’ box, as illustrated by figure 2.

The screenshot shows the 'Dose Estimate' software window. The title bar reads 'Dose Estimate' with standard window controls. The menu bar includes 'File', 'Options', 'Case Report', and 'About...'. The main area is titled 'Aberration Dose Estimate' with a subtitle: 'Dose estimated using yield of aberrations and pre or user-defined calibration curve, for whole body or fractionated/protracted dose'.

Input fields include:

- Number of cells: 1000
- Confidence level (%): 95
- Aberrations: 13
- Add distribution of aberrations
- Calibration coefficients: A dropdown menu and a 'Load saved coefficients' button.
- Yield = $0.0005 + 0.0165 * D + 0.0628 * D^2$ with standard errors below each term.
- Fractionated or Protracted dose section:
 - Fractionated dose
 - Protracted dose
 - Mean lifetime of breaks: 2 hours
 - Total exposure time: 4 hours
 - How many fractions?: 4
 - Mean interfraction time: 4 hours
- Suspected dose (Gy): 0.5

The results panel on the right displays:

- 13 aberrations in 1000 cells
- Distribution: D0: 990, D1: 8, D2: 1, D3: 1
- Variance/mean: 1.604 +/- 0.043; u: 14.050
- Yield: 0.013 ± 0.006
- Calibration curve: Yield curve used: $0.0005 + 0.0165 * D + 0.0628 * G * D^2$; Calculated value of G: 0.568
- Dose (Gy): 0.404 ± 0.080
- Odds ratio for zero dose:suspected dose 1.000:7.302E7
- Odds ratio for zero dose:suspected dose 1.000:1.861E9
- Odds ratio for mean dose:suspected dose 25.490:1.000
- Confidence limits from exact poisson error on yield:
 - Upper 95% limit: 0.935 Gy for 35.660 dicentric
 - Lower 95% limit: 0.157 Gy for 4.315 dicentric
 - Minimum resolvable dose: 0.120 Gy for 3 dicentric

Buttons at the bottom include 'Calculate', 'Clear', and 'Close Dose Estimate'.

Figure 2: The results of a dose estimate for a fractionated dose, compared to a suspected dose, and including Poisson testing

In the case represented by the above figure, 13 aberrations were observed in 1000 cells. The exposure was suspected to be from a gamma source, and hence the HPA’s Cobalt-60 calibration curve was used [6]. Distribution testing was carried out, and it is clear from the variance/mean ratio and u-test values that the aberrations are overdispersed with respect to the Poisson model,

therefore the standard errors were increased accordingly. The exposure was known to have occurred in approximately 4 hourly fractions, occurring approximately 4 hours apart, thus the G-function was applied accordingly. A badge dose of 0.5 Gy was available, thus the odds ratios could be calculated. The results show that the calculated dose was approximately 0.4 Gy. Taken in conjunction with the confidence limits and calculated odds ratios, it is thus extremely likely that the exposure was real and of a level that requires further action.

2.5 Saving the results - the case report

The 'Clear' button is used to clear all data from the 'Results' box. Selecting 'Save' from the 'File' drop down menu allows the user to save the data displayed in the results box or close the software. The 'Options' menu may be used to switch between the dose estimation tools.

In addition, for this and all the other calculation methods included in the Dose Estimate program, whenever a calculation is carried out, the results are automatically appended to a case report page. This can be viewed by selecting 'Case Report' on the menu bar and then 'View' from the drop down menu. Text can be added to the case report page as desired. The report may be cleared by selecting 'Clear' from the 'Report' menu on the case report screen. The case report can also be saved at any time by selecting 'Save' from the 'Case Report' menu on any of the calculation screens or on the case report 'Report' menu.

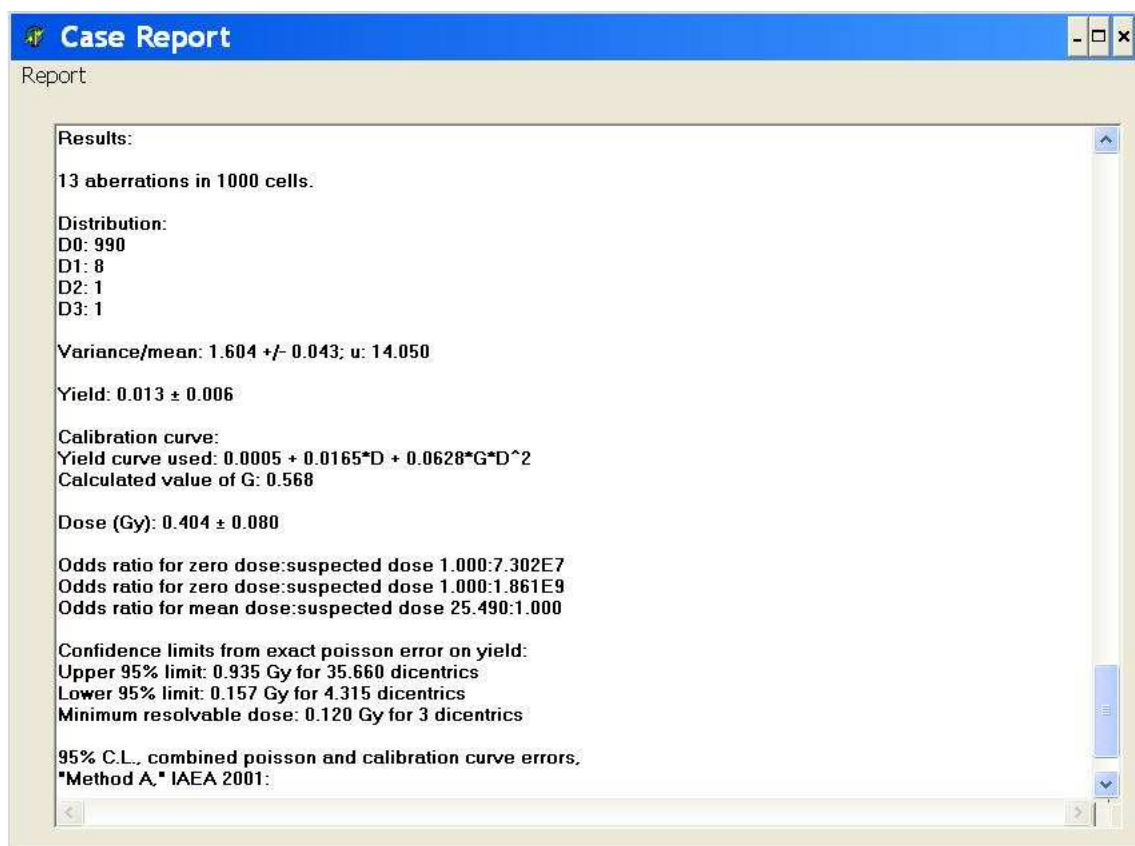


Figure 3: The results of an aberration dose estimate saved to the 'Case Report' screen

3 Isotropic sources

'Isotropic Sources' is the second calculator listed on the 'Options' menu. This tool uses the inverse square law to estimate the dose at a distance, d , from a source with known activity, A .

The screenshot shows a window titled "Dose Estimate" with a menu bar containing "File" and "Options". The main content area is titled "2. Simple Isotropic Dose" and contains the following text: "Dose estimated for whole body exposure at distance d (cm) from a simple isotropic source". Below this text are several input fields and a "Calculate" button. The "Source" field is a dropdown menu with "Ir-192" selected. The "Dose Constant" field is a text box containing "0.59163" with the unit "R h⁻¹ for 1 Ci at 1 m" to its right. The "Distance" field is a text box containing "50" with the unit "cm" to its right. The "Units" field is a dropdown menu with "Ci" selected. Below it is another dropdown menu with "Gy/h" selected. The "Activity" field is a text box containing "30" with the unit "Ci" to its right. A "Calculate" button is centered below the "Activity" field. At the bottom of the window, the "Dose Rate" is displayed as "0.6623" with the unit "Sv/hr" to its right. A "Close" button is located in the bottom right corner of the window.

Figure 4: Isotropic dose estimation

A drop down box allows the user to select dose constants from a list of sources. The values are taken from [7]. The dose constant (in Rh^{-1} for 1 Ci at 1 m) may also be manually entered into the text box. The distance from the source, in cm , is entered into the 'Distance' text box. The units of activity (Ci or Bq) and dose rate (Gy or Rh^{-1}) are selected from the drop down boxes, and the activity is entered into the 'Activity' text box. On clicking the calculate button, the inverse square law is then used to calculate the dose rate, in the specified units. The calculated dose rate is displayed at the bottom of the page, as illustrated by figure 4.

The 'Close' button closes the Isotropic sources calculator and returns to user to the first screen: 'Aberration Dose Estimate.' Selecting 'Close' on the 'File' drop down menu may also be used to close this page and return to the original screen.

4 Criticality - combined neutron and gamma exposures

The 'Criticality' calculator is the third calculator listed on the 'Options' menu. This tool allows the user to estimate the contributions from fission neutrons and gamma sources in the case of combined exposure.

The screenshot shows a software window titled "Dose Estimate" with a menu bar containing "File", "Options", and "About...". The main area is titled "Combined Neutron and Gamma Dose" and contains the following text: "Iterative method of estimating dose from a combination of fission neutrons and gamma radiation".

Input fields include:

- Number of cells: 100
- Number of dicentric: 120
- Neutron: Gamma Ratio: 2:3
- Neutron yield = $0.0005 \pm 0.0003 + 0.839 \pm 0.009 * D$
- Gamma yield = $0.0005 \pm 0.0001 + 0.0164 \pm 0.0037 * D + 0.0492 \pm 0.0029 * D^2$

A "Calculate" button is located below the input fields. The results box at the bottom displays:

Neutron dose: 1.210 ± 0.013 Gy. (95% CL: 1.180 to 1.230) for 1.010 Dicentrics/Cell
Gamma dose: 1.810 ± 0.058 Gy. (95% CL: 1.700 to 1.920) for 0.191 Dicentrics/Cell

"Clear" and "Close" buttons are located at the bottom right of the window.

Figure 5: Estimates of combined neutron and gamma dose

The calculator uses an iterative method, as detailed in [1], using the number of cells and number of aberrations, the ratio of neutron:gamma irradiation from physical measurements and the neutron and gamma yield curves. The values of these are entered into the appropriate text boxes. The ratio should be entered in the format neutron:gamma, with a colon as the separator. When the 'Calculate' button is clicked, the neutron and gamma doses, standard errors and confidence limits, and the associated yields are displayed in the 'Results' box at the bottom of the page, as illustrated by figure 5.

The 'Clear' button clears the data from the 'Results' box. The 'Close' button closes the Criticality page and returns to user to the first screen: 'Aberration Dose Estimate.' The 'File' drop down menu may be used to save the data displayed in the results box or close the Criticality tool and return to the original screen.

5 Partial body exposures

The fourth item listed on the ‘Options’ menu is the ‘Partial Body Exposure’ calculator. In the case of partial body exposure, a more realistic estimate of dose may be required than the inhomogenous whole body mean dose. This tool allows estimation of the approximate doses in cases of partial body exposure using either or both of two methods. These are described briefly below and in more detail in [1].

5.1 The ‘Qdr’ method

The Qdr (Dicentric and Ring Quotient) method was first proposed by Sasaki and Miyata (1968) [8]. The method assumes that all cells with dicentrics and rings were present during irradiation. The Qdr ratio is the expected yield of dicentrics and rings amongst the damaged population:

$$Qdr = \frac{X}{N_u} = \frac{Y}{1 - e^{-Y_1 - Y_2}} \quad (4)$$

where X is the observed number of dicentrics plus rings amongst the total number of damaged cells N_u and Y_1 and Y_2 are the yields of dicentrics plus rings (1) and excess acentrics (2).

5.2 The ‘Contaminated Poisson’ method

This method was proposed by Dolphin (1969) [9]. It considers overdispersion of aberrations. If the body is partially irradiated, there will be three populations of cells: 1) Irradiated cells with no dicentrics, 2) Irradiated cells with one or more dicentrics and 3) The remaining unirradiated fraction which are assumed to have no dicentrics. A maximum likelihood estimation may be made of the fraction, f , of cells scored which were irradiated and the associated mean yield, Y , using equations 5 and 6:

$$\frac{Y}{1 - e^{-Y}} = \frac{X}{N - n_0} \quad (5)$$

$$Yf = \frac{X}{N} \quad (6)$$

where N is the number of cells scored, X is the observed number of aberrations (dicentrics plus rings) and n_0 is the number of cells free of aberrations.

To calculate doses and yields using one or both of the above methods, first select one or both of the methods desired by clicking the ‘Qdr method’ and/or the ‘Contaminated Poisson method’ selection boxes - methods are selected when a tick appears in the adjacent box. The total number of cells scored and the numbers of damaged cells, dicentrics, centric rings, cells with no dicentrics and the mean lethal dose $D0$, are entered into the appropriate text boxes. $D0$ is used to correct for the fact that irradiated cells can be killed at interphase so the fraction f seen at metaphase is not the same as the fraction F irradiated. For gamma irradiation, $D0$ is approximately 3.5 Gy ; for x-rays it is about 2.7 Gy [1] - a default value of 2.7 Gy is given, but this may be manually altered by the user. For the Qdr method the yields of dicentrics plus rings and excess acentrics must be specified in the text boxes on the ‘Qdr Method’ panel. If the modified method of using dicentrics only is to

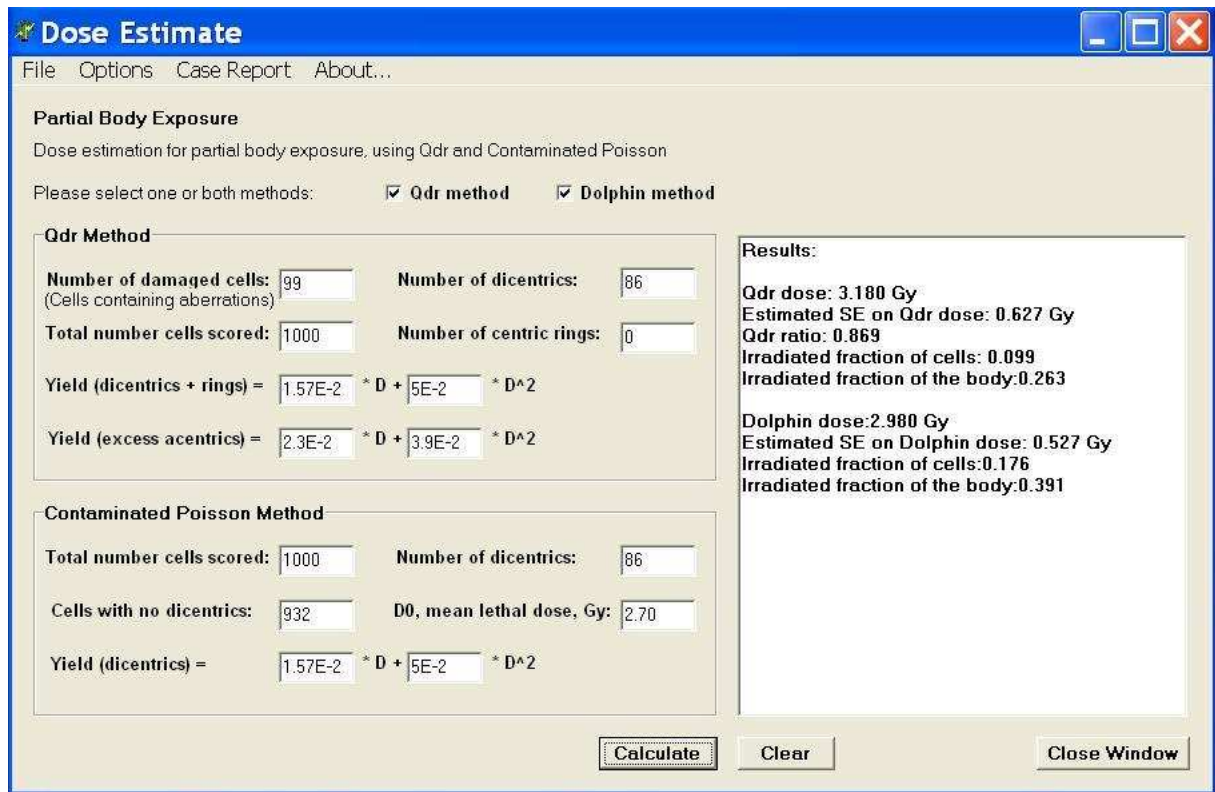


Figure 6: Estimating dose for partial body exposures

be used, then values of 0 must be entered into the centric rings and excess acentric yield coefficient boxes.

On clicking the 'Calculate' button, an iterative calculation is carried out to find the Qdr ratio and hence the dose in *Gy* and the estimate standard error on this dose (based on the Poisson SE of the yield of dicentrics), the irradiated fraction of cells and the body, and the corresponding values for the Contaminated Poisson method, if selected. The calculated values are displayed in the 'Results' text box, as illustrated by figure 6.

The 'File' drop down menu may be used to save the data displayed in the results box or close the Partial body exposure calculator and return to the original screen. The 'Clear' button clears the data from the 'Results' box. The 'Close' button closes the current page and returns to user to the first screen: 'Aberration Dose Estimate.'

6 Yield curve fitting

The curve fitting tool allows the user to calibrate the dose response curve for dose estimation using chromosome aberrations (e.g. dicentrics). The tool gives the yield and standard error for a number of aberrations at a given dose. The ratio of variance to mean and u-test statistic for a distribution of aberrations can also be calculated. The blank page as it is opened is illustrated by figure 7.

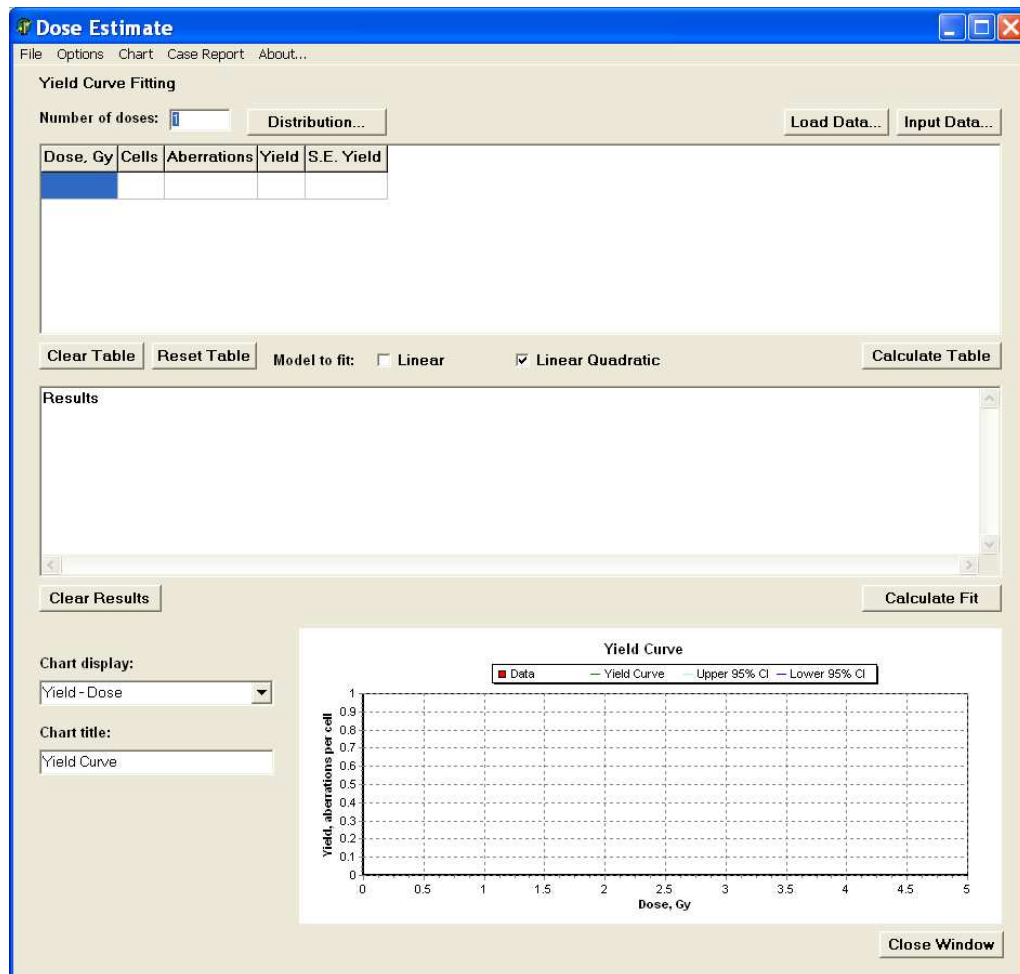


Figure 7: The yield curve fitting screen

The number of data points (e.g. doses used for the calibration) should be entered into the text box at the top left hand side of the page. If desired, distribution testing can be carried out on its own or as part of the curve fitting procedure. Clicking the button marked ‘Distribution...’ will cause an input box to appear asking the user to enter the maximum number of aberrations in any one cell (figure 8). The corresponding number of columns will be added to the data input table, together with columns for the results of the variance to mean ratio and u-test, plus the NDI and SE on NDI.

Doses, cells, aberrations (and distribution of aberrations,¹ if desired) can be entered into the table in one of several ways. Data may be entered by hand, by clicking in the required box and typing the appropriate number. The arrow keys can be used to navigate the table. For convenience, data can be entered manually by clicking the ‘Input Data’ button. This causes the appearance of a series of input boxes, prompting the user to enter dose, number of cells, and number of aberrations for each dose, up to the number of doses given in the text box at the top of the screen (figure 9). Data may also be loaded from a text file. In this case, the data must be listed in columns of dose, cells, aberrations, then the distribution - numbers of cells with 0, 1, ..., N aberrations. The columns

¹The frequencies of cells with 0, 1, 2 etc. dicentric

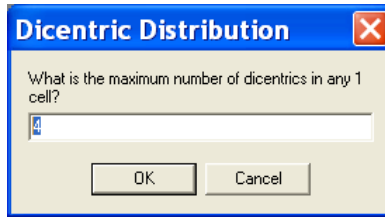


Figure 8: Adding dicentric distribution data to the data table

should be separated by a space or tab, as illustrated by figure 10.

Data may also be copied and pasted into the table from an external file, such as Microsoft Excel ®. This is done by clicking in the top left hand cell where the data are to be pasted, holding down the shift key, and using the arrow keys to highlight the entire selection of cells where the data are to be pasted. Please note that the correct number of cells in the table must be selected for pasting and only highlighted cells will be filled.

Once the data are entered into the table, clicking the 'Calculate Table' button will result in the yield and standard error in the yield being displayed in the table. If the distribution of aberrations has been included in the table, these values are used to calculate the ratio of variance/mean and the 'u' statistic to test for Poissonion distribution, as described in Edwards (1979) [2]. Values of variance/mean of $\simeq 1$ indicate that the data are Poisson distributed. The data are under or overdispersed if the value(s) of 'u' deviate from ± 1.96 . If this is the case, the values of standard error are automatically adjusted (using the mean value of the variance to mean ratio) to account for this deviation from the Poisson distribution. The Nuclear Division Index (NDI) and the standard error on the NDI are also calculated [10]. The NDI is a measure of cell division which can be used to investigate the mitogenic response of lymphocytes and the cytostatic effects of various agents. The error calculation for the NDI is based on the multinomial distribution, and full details will be available in the updated version of the IAEA manual, which is due for publication in late 2010. NDI is normally only relevant for the micronucleus assay [11].

For curve fitting, in order to calculate the yield curve coefficients, either the 'Linear' or 'Linear Quadratic' models should be selected, depending on the curve required. On clicking the 'Calculate' button, the yield coefficients are then calculated using maximum likelihood method as described by [12].

The yield curve, with the values of α , β and C, and standard errors for each of the coefficients, are displayed in the 'Results' text box. The results of the weighted chi squared analysis, degrees of freedom and the p value for the fit are also given. A value of chi squared (χ^2) significantly different from the number of degrees of freedom indicates a poor fit. In this case, the standard errors on the yield are automatically increased by $\sqrt{\frac{\chi^2}{df}}$ to account for this. Additionally, z-test p values are given for each coefficient. A lack of significance of individual coefficients indicates a poor fit to the chosen (linear or linear quadratic) model.

The fitted data, calculated yield curve and the 95% confidence intervals on the curve are plotted on the chart at the bottom of the page, as illustrated by figure 11. The 'Chart title' text box may be used to change the title of the chart. The 'Chart' drop down menu may be used to alternate the chart view between the yield curve and damaged cells with dose, and save the chart in picture format. Please note that the file extension should be specified when the chart is saved, for instance

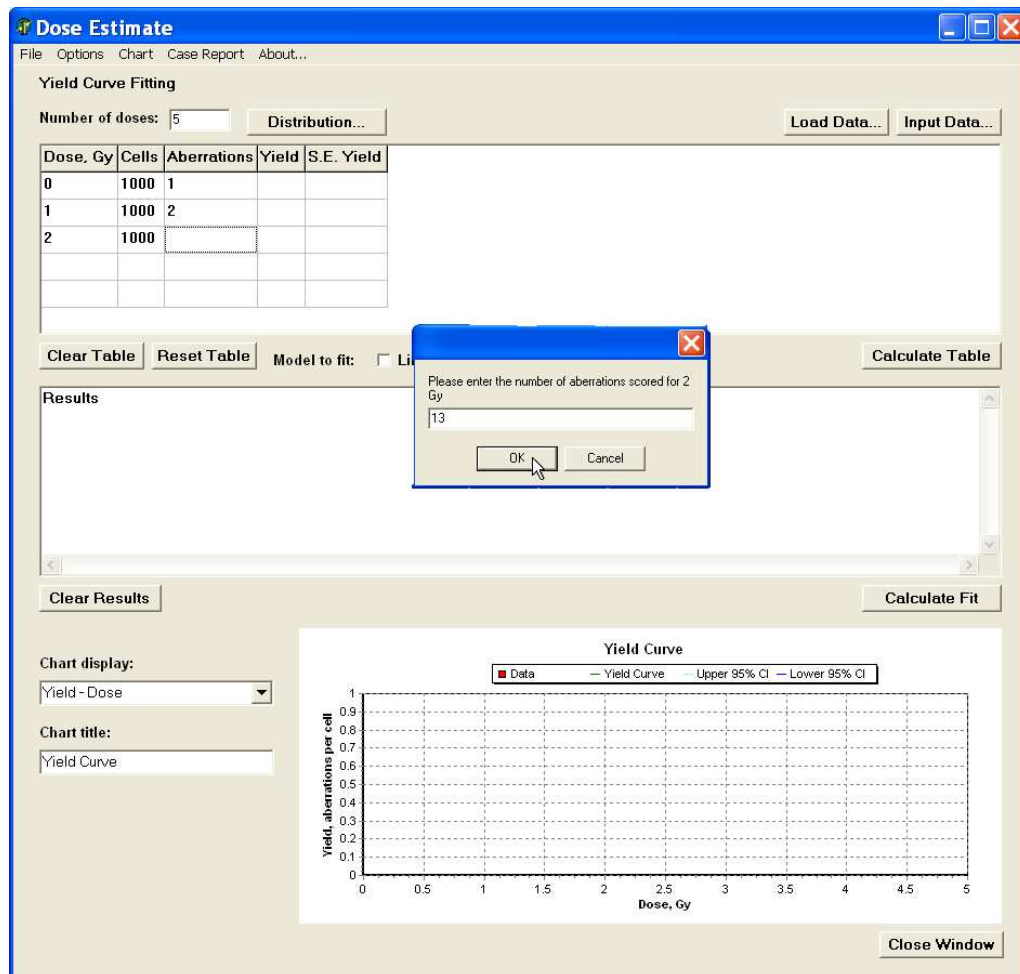


Figure 9: Manual entry of yield curve data

‘chart1.jpg’ or ‘chart1.bmp.’

The ‘File’ drop down is used to save the fitted curve so that the coefficients can later be used for aberration dose estimation. On clicking File—Save Fitted Curve, an input box appears asking the user to specify a short descriptive name for the curve. Please note that spaces should not be included in this description - use a single word or an underscore to separate words. The calibration coefficients are then saved to the Windows registry. When Dose Estimate is next restarted, the description will appear in the ‘Calibration coefficients’ drop down box on the ‘Aberration Dose Estimation’ screen and the fitted curve can then be used to calculate estimated doses.

The file menu can also be used to close the calculator and return to the first screen: ‘Aberration Dose Estimation.’ The ‘Clear Table’ button will clear data from the table. The ‘Reset Table’ button will return the table to the original version with five columns: doses, cells, aberrations, yield and standard error. The ‘Clear Results’ button will clear the results from the ‘Results’ box. The ‘Close’ button closes the current page and returns to user to the original screen.

File	Edit	Format	View	Help												
0.05	2107	3	2104	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.12	1760	6	1754	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.23	1423	12	1411	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.26	993	7	986	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.3	1000	10	990	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.36	500	7	493	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.52	628	18	610	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.82	1000	68	937	58	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.03	1557	138	1424	128	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.5	500	104	407	82	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.98	986	339	686	266	30	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.06	269	210	123	93	42	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.09	214	308	41	85	54	24	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0
4.52	237	336	57	77	66	29	4	1	2	2	1	0	0	0	0	0
5.05	104	208	12	30	30	16	10	6	0	0	0	0	0	0	0	0

Figure 10: The format of data to be loaded into Dose Estimate from a text file

7 Translocation analysis

The translocation analysis calculator is the sixth item on the ‘Options’ menu. While aberrations such as dicentrics are relatively transient, translocations are known to be persistent for many generations, and so are more suitable for dose assessment for long time points after exposure. The FISH method has been developed to assess translocation frequency. The calculations for Dose Estimate are carried out using methods described in [1]. Morton (1991) [13] gives the relative DNA content of male and female human chromosomes in tabular form. Lucas (1992) [14], describes equations for calculating the full genome equivalent translocation frequency from a painted fraction:

$$\frac{F_P}{F_G} = 2.05 \times [\sum f_i(1 - f_i) - \sum f_i f_{j,i < j}] \quad (7)$$

where f is the percentage of DNA content painted with colour numbers i and j , calculated from the tables in [13]. F_P is the painted fraction of the genome and F_G is the full genome equivalent number of cells.

In order to carry out the calculations described above, the sex of the donor, type of painting (one or two or more colours), and number of chromosome pairs per colour (usually 3), are entered into the appropriate boxes at the top of the page. If ‘Two or more colours’ is selected, an input box appears asking the user to enter the number of colours used.

The number of data points must then be entered into the box and the corresponding numbers of cells and translocations into the first two columns of the table. As above, data may be copied and pasted into the table or entered directly into the individual cells.

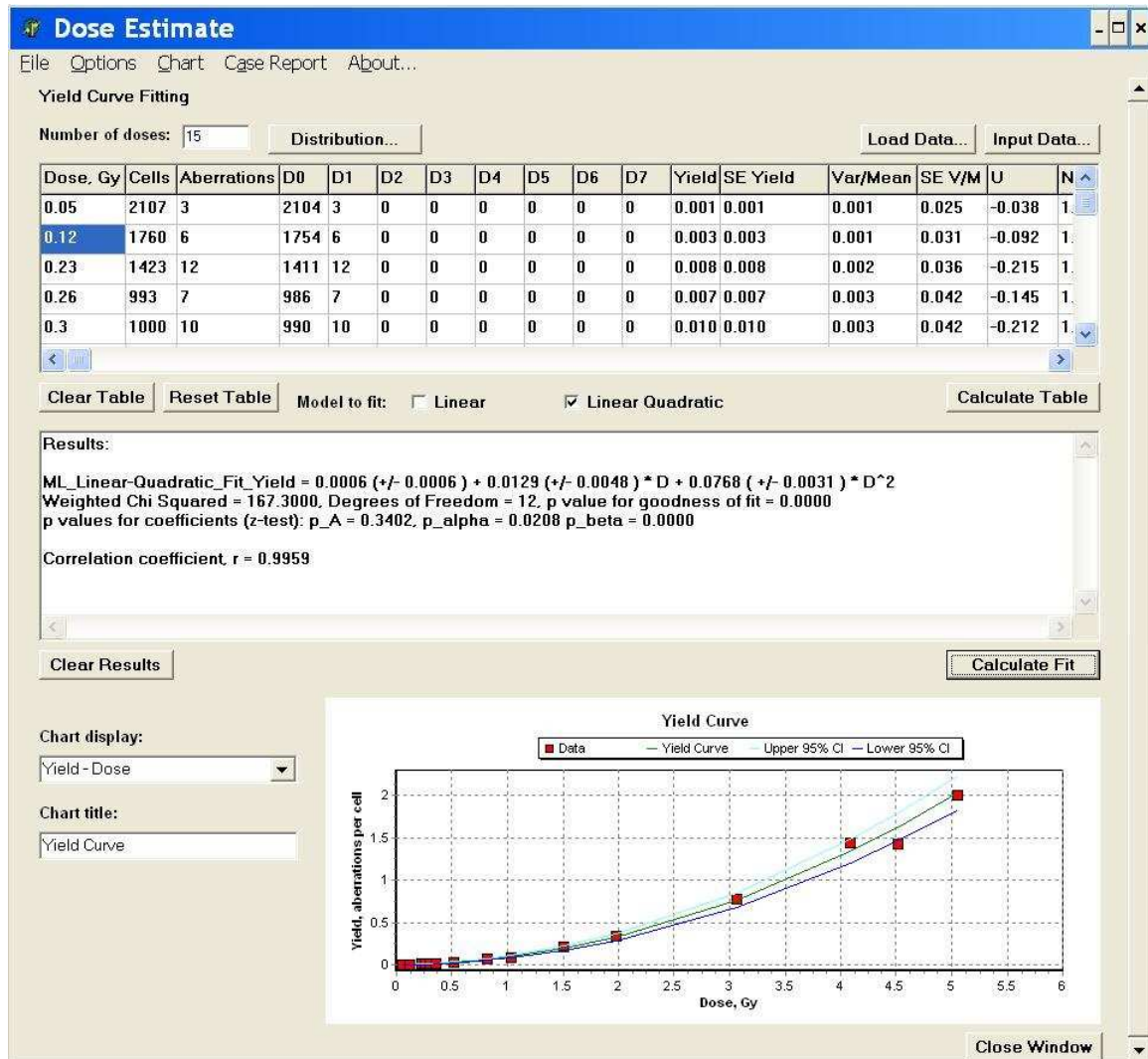


Figure 11: Yield curve fitting

When the ‘Calculate’ button is clicked, a number of input boxes appear (corresponding to the specified number of chromosome pairs), asking the user to enter the chromosome numbers for each pair used in the analysis, as in figure 12. Chromosome X should be referred to as ‘23,’ chromosome Y as ‘24.’ The age of the patient is also requested, to allow comparison with expected mean background frequencies of translocations from the recent metastudy [15].

The full genome equivalent number of cells for each data point is displayed in the third column of the table, as illustrated by figure 13. The number of chromosome pairs, the chromosome numbers and the ratio of $\frac{F_P}{F_G}$ are then displayed in the ‘Results’ box, together with the expected number of translocations from Sigurdson *et al.* 2008 [15].

The ‘File’ drop down menu may be used to save the data displayed in the table and the results box or close the calculator and return to the first screen: ‘Aberration Dose Estimate.’ The ‘Clear Table’ button will clear the table. The ‘Clear Results’ button will clear the results from the ‘Results’ box. The ‘Close’ button closes the current page and returns to user to the original screen.

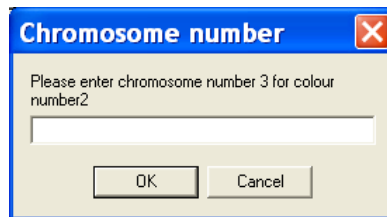


Figure 12: Entering numbers of painted chromosomes

8 Other statistics

The final page listed on the 'Options' menu is 'Other Stats.' This page allows the user to perform statistical tests which are commonly used in assessing cytogenetic data.

The chi squared test is used to evaluate statistically significant differences between proportions of normally distributed results. The chi squared test for one degree of freedom is used to compare observed and expected counts. In this case χ^2 is calculated using the normal approximation to the binomial distribution. The chi squared test for homogeneity allows comparison of more than two sets of results, testing the null hypothesis that the relative frequencies of observed events follow the chi squared distribution. The p value for the χ^2 statistic (with the associated number of degrees of freedom) gives the probability of differences between the results being due to chance.

The t-test is a statistical hypothesis test for which the null hypothesis is true if the test statistic, t , is t-distributed (for a small sample from a normally distributed population). It is usually used to test for the significance of a difference between two Poisson counts, comparing the means to determine whether the two sets of data have come from the same population. The paired t-test is used for samples with direct dependence (e.g. numbers of dicentrics scored by person 1 and person 2 on 1 set of slides), in which case the sample sizes must be equal. The unpaired test is for independent sets of data, for example numbers of dicentrics scored by person 1 and person 2 on 2 sets of slides. In this case the sample sizes may be unequal.

Figure 14 illustrates calculations using all three of the methods.

8.1 Chi squared test for homogeneity

This test is used to compare the homogeneity of several measurements of cells and aberrations. The number of measurements is entered into the text box at the top of the screen. The data can then be entered manually into the data entry table or loaded into the table as above. If data is to be loaded from a text file, the data must be in the format of two columns: total cells scored and aberrations for each measurement, separated by a space or tab. The chi squared test for homogeneity is then carried out. The values of χ^2 , degrees of freedom, df , and the p value are displayed in the text boxes at the bottom of the page. The data are generally assumed to be significantly inhomogenous if $p \leq 0.05$.

The 'Clear' button will clear the data from the 'Results' box. The 'Clear Table' button will clear all the data from the table.

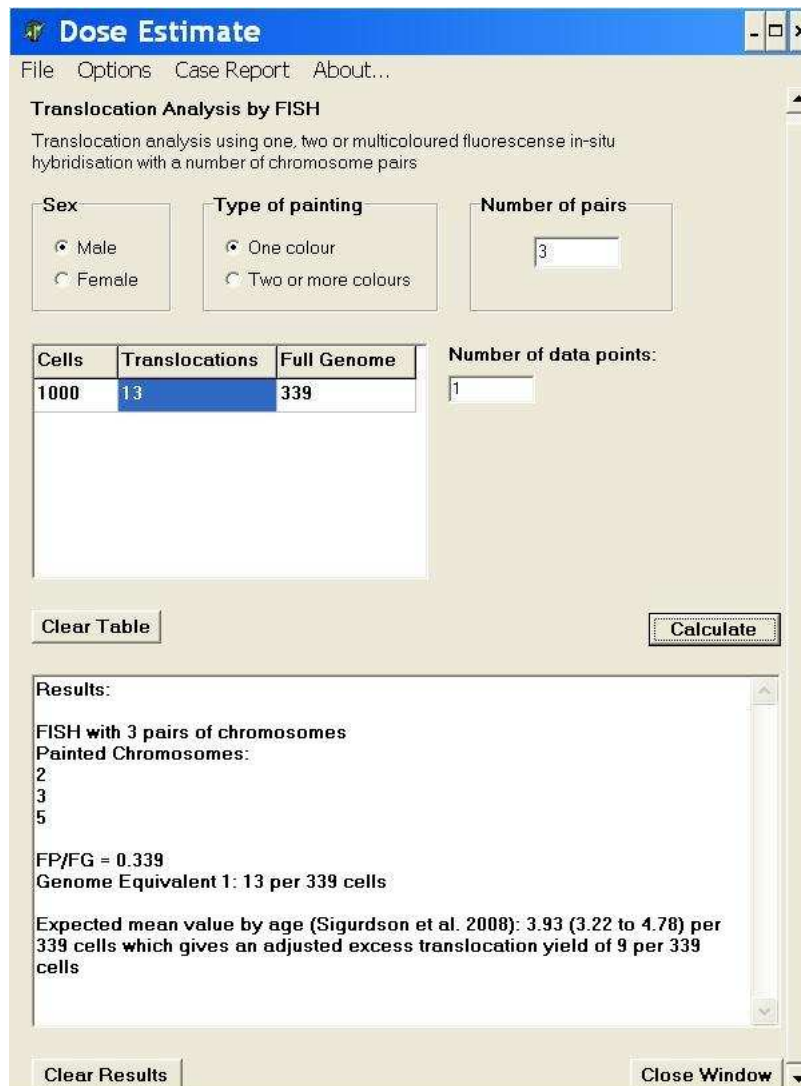


Figure 13: Analysis results and comparisons to expected translocations from [15]

8.2 Chi squared test with one degree of freedom

In the special case of comparison of two samples (e.g. a control to a measurement), the data are expected to be distributed binomially. If the number of measurements is sufficiently large, then this may be approximated by a Gaussian distribution (the Pearson test statistic is then the square of one standard normal deviate, distributed as chi squared with one degree of freedom).

The numbers of cells and aberrations for the control and sample are entered into the table by clicking on a cell and entering the value of each into the input box. When the 'Calculate' button is clicked, χ^2 and the p value are displayed in the 'Results' box.

The 'Clear' button will clear the data from the 'Results' box. The 'Clear Table' button will clear all the data from the table.

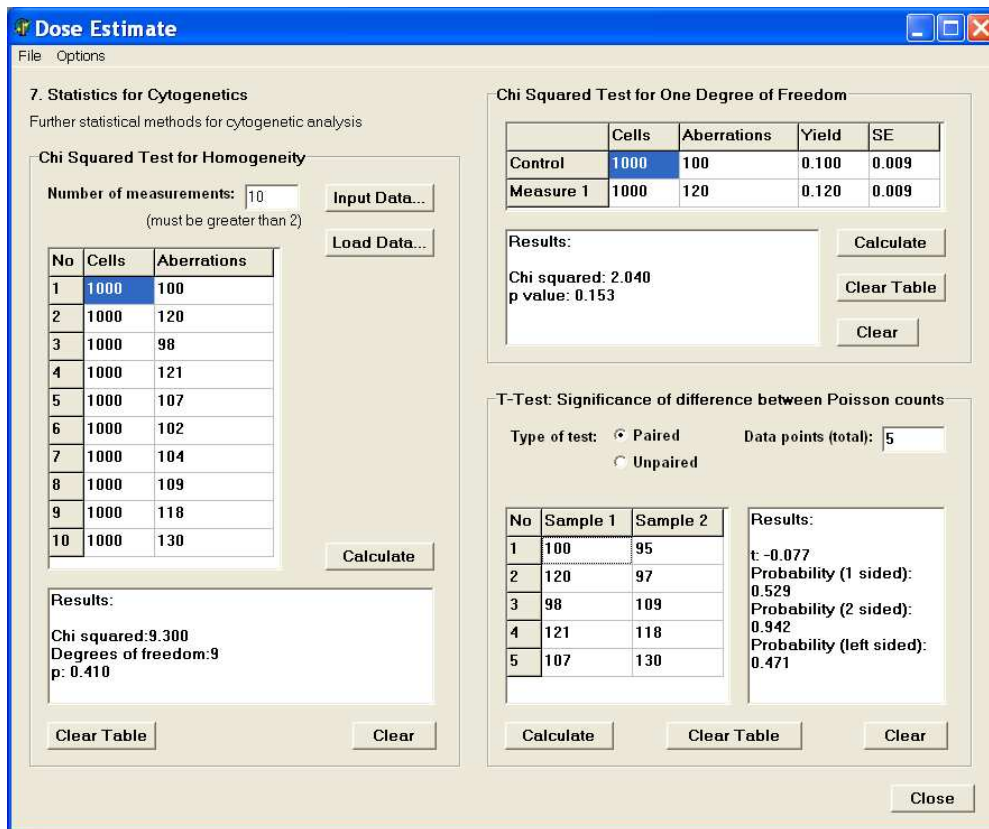


Figure 14: The final page of Dose Estimate allows the user to perform statistical tests that are commonly used in cytogenetics

8.3 T-test for significance of difference between two Poisson counts

The type of test, paired or unpaired must first be selected. If a paired test is selected, then the number of data points for each sample is then entered into the 'Data points' text box. If 'Unpaired' test is selected, the number of data points for each sample must be entered into the text boxes. The data for each sample is then entered into the table manually or by copying and pasting (remembering to highlight all the cells into which the data is to be pasted). When the 'Calculate' button is clicked, the t statistic and p values for the left hand side ($t_{Calculated} \leq t_{Critical}$, one sided probability (Sample 1 < Sample 2) and two sided (Sample 1 <> Sample 2) distributions are displayed in the 'Results' box. The results are generally assumed to be significant if $p \leq 0.05$.

The 'Clear' button will clear the data from the 'Results' box. The 'Clear Table' button will clear all the data from the table. The 'Close' button closes the 'Other Statistics' screen and returns to user to the original screen. The 'File' drop down menu may also be used to close the current page and return to the original screen.

9 Further notes

Please note that in order to paste data into the tables in Dose Estimate, the correct number of cells in the table must be selected. Only highlighted cells will be filled. This is to ensure that the correct number of data points are specified on each occasion, as many of the calculations depend on these numbers.

The p values are calculated using algorithms based on probability functions taken from Abramowitz and Stegun (1972) [16].

Further discussion on the relative merits of the calculation methods utilised by Dose Estimate and some numerical examples may be found in [3].

References

- [1] IAEA. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. Technical Report Series No. 405, International Atomic Energy Agency, 2001.
- [2] Edwards AA, Lloyd DC, and Purrott RJ. Radiation induced chromosome aberrations and the poisson distribution. *Radiation and Environmental Biophysics*, 16:89 – 100, 1979.
- [3] Szluinska M, Edwards AA, and Lloyd DC. *Statistical methods for biological dosimetry in Chromosomal aberrations, methods, results and importance in human health*. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [4] Lea DE and Catcheside DG. The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in *Tradescantia*. *Journal of Genetics*, 44:216 – 245, 1942.
- [5] Bauchinger M, Schmid E, and Dresch J. Calculation of the dose-rate dependence of the de-centric yield after Co gamma-irradiation of human lymphocytes. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 35(3):229–233, Mar 1979.
- [6] Lloyd DC, Edwards AA, Prosser JS, and Corp MJ. The dose response relationship obtained at constant irradiation times for the induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by cobalt-60 gamma rays. *Radiat Environ Biophys*, 23(3):179–189, 1984.
- [7] Unger LM and Trubey DK. Specific gamma-ray dose constants for nuclides important to dosimetry and radiological assessment. Technical Report ORNL/RSIC-45/Rev.1, Oak Ridge National Lab., TN (USA), 1982.
- [8] Sasaki M and Miyata H. Biological dosimetry in atom bomb survivors. *Nature*, 220:1189 – 1193, 1968.
- [9] Dolphin GW. Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberrations analysis. A review of methods. In *Handling of Radiation Accidents (Proc. Int. Symp. Vienna)*, 1969.
- [10] Eastmond DA and Tucker JD. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13:34–43, 1989.

- [11] Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.*, 455:81–95, Nov 2000.
- [12] Papworth DG. Curve fitting by maximum-likelihood. *Radiat. Botanic.*, 15:127–140, 1975.
- [13] Morton NE. Parameters of the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88:7474 – 7476, 1991.
- [14] Lucas JN, Awa A, Straume T, Poggensee M, Kodama Y, Nakano M, Ohtaki K, Weier HU, Pinkel D, Gray J, and Littlefield G. Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 61(1):53 – 63, 1992.
- [15] Sigurdson AJ, Ha M, Hauptmann M, Bhatti P, Sram RJ, Beskid O, Tawn EJ, Whitehouse CA, Lindholm C, Nakano M, Kodama Y, Nakamura N, Vorobtsova I, Oestreicher U, Stephan G, Yong LC, Bauchinger M, Schmid E, Chung HW, Darroudi F, Roy L, Voisin P, Barquinero JF, Livingston G, Blakey D, Hayata I, Zhang W, Wang C, Bennett LM, Littlefield LG, Edwards AA, Kleinerman RA, and Tucker JD. International study of factors affecting human chromosome translocations. *Mutation Research*, 2008.
- [16] Abramowitz M and Stegun IA, editors. *Handbook of mathematical functions*. Dover Publications, Inc., 1972.