



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Universidad De La República Oriental del Uruguay, Facultad de Medicina de Montevideo,
Departamento de Biofísica, Laboratorio de Radiobiología.

Estudios de radiosensibilidad en linfocitos de mujeres de 20 a 40 años

Montevideo, Uruguay 2022

Camila Aida¹, Sofía Andino¹, Nahir Baridon¹, Mateo Fontes¹, Julieta Perez¹, Nelson Bracesco²,
Búrix Mechoso²
Grupo 52.

Contacto: nahirbaridonpons@gmail.com

1 Ciclo de Metodología Científica II 2022-Facultad de Medicina - Universidad de la República,
Montevideo, Uruguay

2 Laboratorio de Radiobiología, Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina - Universidad
de la República, Montevideo, Uruguay

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO

Índice de figuras 3

Resumen..... 4

Abstract 4

Introducción 5

Objetivo general y objetivos específicos..... 10

Metodología 11

Resultados: 13

Discusión: 18

Conclusiones y perspectivas..... 20

Referencias Bibliográficas 21

Agradecimientos 23

Anexos 24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1..... 6

Figura 2..... 7

Figura 3..... 8

Figura 4..... 14

Figura 5..... 15

Figura 6..... 15

Figura 7..... 16

Figura 8..... 17

Figura 9..... 17

RESUMEN

Objetivos: estudio de radiosensibilidad en mujeres de 20 a 40 años de edad.

Metodología: se utilizaron 8 muestras de linfocitos extraídos de sangre periférica tratados con Bleomicina durante la fase G2, contabilizando las aberraciones cromosómicas resultantes como biomarcador de radiosensibilidad.

Cada muestra fue dividida en 2 tubos y se sembró 1 mL en medio de cultivo RPMI, adicionando suero fetal bovino y fitohemaglutinina. Se estudiaron los linfocitos en dos grupos independientes, uno expuesto a Bleomicina y otro, asignado como grupo control, no expuesto. Dentro del grupo control y el grupo de expuestos se realizaron dos conjuntos de muestras, unas expuestas a cafeína y otras no expuestas, con el objetivo de inhibir la reparación del ADN en la fase G2 del ciclo celular. Luego se observaron las metafases teñidas con DAPI en un microscopio de fluorescencia y se realizó el conteo de aberraciones cromosómicas con el procesador Metafer4.

Resultados: al aplicar análisis estadísticos no paramétricos, se encontró un aumento en la formación de aberraciones cromosómicas en grupos expuestos a Bleomicina en comparación al grupo control y se comparó el índice de radiosensibilidad entre las donantes encontrando diferencias significativas en ambos casos.

Conclusiones: en este estudio experimental in vitro se evidenció la aparición espontánea de aberraciones cromosómicas en el grupo de linfocitos expuestos a Bleomicina y la existencia de radiosensibilidad interindividual. Estos hallazgos pueden contribuir a futuras investigaciones para profundizar en el tema.

Palabras clave: radiosensibilidad, mujeres, aberraciones cromosómicas, radiomiméticos, linfocitos.

ABSTRACT

Objectives: radiosensitivity study in healthy women between 20 and 40 years of age.

Methods: lymphocytes extracted from peripheral blood treated with Bleomycin were evaluated on 8 donors during the G2 phase, measuring chromosomal aberrations as a biomarker of radiosensitivity.

Each sample was divided into 2 tubes and 1 mL was sown in RPMI culture medium, adding fetal bovine serum and phytohemagglutinin. Lymphocytes were studied in two independent groups, one exposed to Bleomycin and the other, assigned as a control group, not exposed. Within the control group and the exposed group, two sets of samples were performed, some exposed to caffeine and others not exposed, with the aim of inhibiting DNA repair in the G2 phase of the cell cycle. DAPI-stained metaphases were then observed under a fluorescence microscope and counting of chromosome aberrations was performed with the Metafer4 processor.

Results: By applying non-parametric statistical analysis, an increase in the formation of chromosomal aberrations was found in groups exposed to Bleomycin compared to the control group and also the radiosensitivity index was compared between the donors, finding significant differences in both cases.

Conclusions: In this in vitro experimental study, the spontaneous appearance of chromosomal aberrations in the group of lymphocytes exposed to Bleomycin and the existence of interindividual radiosensitivity were evidenced. These findings may contribute to future research to go deeper into the subject.

Keywords: Radiosensitivity, women, chromosomal aberrations, radiomimetics, lymphocytes.

INTRODUCCIÓN

Se define radiación a la propagación de energía en el espacio; que posee dirección y sentido. Las radiaciones ionizantes tienen la capacidad de generar cambios atómicos y/o moleculares, como excitación e ionización durante el proceso de absorción de energía por el material biológico. Estas son utilizadas en la medicina tanto para diagnóstico, como tratamiento de enfermedades (1).

La radioterapia, comenzó a utilizarse en el Siglo XIX para tratar un cáncer de estómago y se observó la reducción del tamaño tumoral como primer parámetro cuantificable del efecto de la radiación. En 1901 Pierre Curie se aplicó 1 gramo de Radio sobre el antebrazo y observó que se generaba una descamación, eritema y necrosis, pero no pudo hacer más que la observación por falta de un parámetro cuantificable de la acción de las radiaciones ionizantes sobre los tejidos sanos.

Ya en 1906, la Asociación Francesa para el avance de la Ciencia (AFAS) deducía que había dos causas de error que pueden afectar la aplicación terapéutica de los rayos X por un lado la incertidumbre de las medidas y dosis y por otro, la sensibilidad de los diferentes sujetos, de las diversas partes de la piel, etc. Después de una discusión, se aprobó por unanimidad la siguiente moción: "la sección de electricidad médica del congreso celebrado en Lyon admite después de la discusión que con dosis iguales evaluadas con los indicadores actuales, ciertos individuos en condiciones especiales pueden presentar reacciones algo diferentes" (2). Es así, como el concepto de radiosensibilidad comienza a cobrar relevancia para los investigadores.

La radiosensibilidad se define como la capacidad o susceptibilidad de diferentes células o tejidos vivos de expresar fenómenos biológicos al interactuar con una radiación ionizante (3). La variabilidad de la respuesta depende de la radiación aplicada, pero hay un componente individual muy importante que engloba el genotipo y el fenotipo. Este concepto se puede ejemplificar con la población infantil, quienes por tener una alta capacidad mitótica son más radiosensibles que los adultos, especialmente aquellos menores a 10 años. Mientras más cercano a la edad neonatal, mayor es la radiosensibilidad. Además, como tienen una menor masa corporal tienen mayor capacidad de absorción (1). La base de este suceso se establece por las leyes de Bergonie y Tribondeau, "...que indican que una célula es más radiosensible cuanto mayor sea su capacidad reproductora, más largo sea su porvenir cariocinético y cuanto menor sea su diferenciación. El nivel de daño que ocasiona la radiación tiene una variación interindividual la cual es cuantificable (4).

En la formación de dicho daño cobra un papel fundamental los mecanismos de reparación del ADN, los cuales determinan la radiosensibilidad. Dentro del ciclo celular, la fase G2 es la de mayor relevancia, ya que en esta se encuentran uno de los puntos de control o “checkpoints” y además es la fase del ciclo celular más sensible a la radiación. Estos puntos de control permiten detener el ciclo y reparar el ADN en caso de estar dañado, de manera que no progrese dicho error dentro del ciclo celular, propagándose a las células hijas (5).

Diversos estudios in vitro han demostrado la aparición de aberraciones cromosómicas y micronúcleos ante la exposición a radiaciones ionizantes, pudiendo así utilizar estas alteraciones para determinar la radiosensibilidad de las células en estudio (6). La forma en que se puede cuantificar esta variación es mediante técnicas de dosimetría biológica; estas estiman la dosis absorbida de radiación de cada individuo. Algunas de estas técnicas utilizan el conteo de aberraciones cromosómicas en linfocitos, interpretando luego este conteo mediante una curva de calibración curva-respuesta. La cantidad de alteraciones observadas en dichos linfocitos representa en promedio la dosis absorbida por el cuerpo del sujeto, ya que los linfocitos al estar en el torrente sanguíneo, recorren todo el cuerpo.

Las aberraciones cromosómicas se pueden definir como las alteraciones que ocurren en la estructura de los cromosomas de las células.

Las radiaciones ionizantes provocan aberraciones del tipo cromosómico en los linfocitos periféricos ya que estos se encuentran en una fase G0 del ciclo celular, el estado de quiescencia. Dichas aberraciones cromosómicas se clasifican en estables o inestables; las inestables son: dicéntricos, principal aberración utilizada para medir la dosis de radiación absorbida también conocida como la alteración gold standard (7), anillos céntricos y acéntricos como se muestran en la Figura 1. Las estables son: translocaciones recíprocas, traslocaciones no recíprocas y traslocaciones intersticiales.

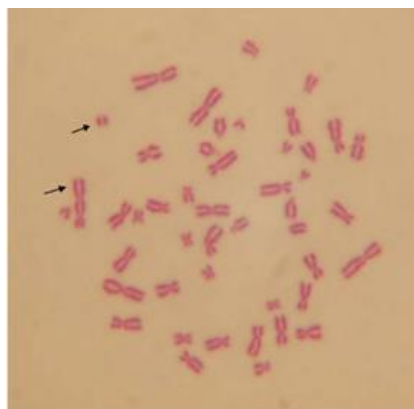


Figura 1. Cromosoma dicéntrico (tinción Giemsa) (7)

Dentro de estos mecanismos de evaluación de daño sobre el componente celular, se ha descrito, además de las aberraciones cromosómicas, la cuantificación y observación de micronúcleos en células binucleadas. Durante la división celular, el ADN contenido en el núcleo celular se replica y se divide de forma equitativa dando como resultado dos células hijas idénticas entre sí. Este proceso puede ser alterado, dando lugar a roturas cromosómicas que dan como resultado fragmentos cromosómicos acéntricos, que no disponen de centrómeros por lo tanto no se incluirán en los núcleos hijos. Eventualmente cromosomas con centrómero podrían incluirse dentro de estos micronúcleos si hubo algún retraso en la separación de los mismos, y al reensamblar la membrana nuclear quedan atrapados en estas estructuras satélites. Dichos fragmentos, pueden ser observados mediante un microscopio óptico, ya que se rodean de membrana celular y aparecen como pequeños núcleos (Figura 2) (8).

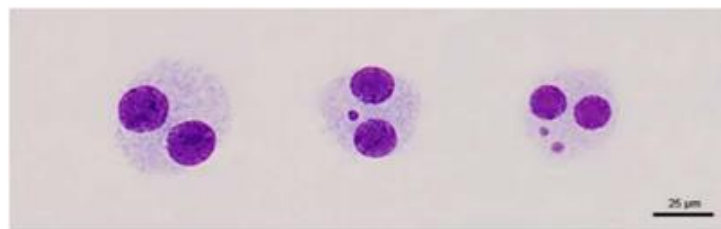
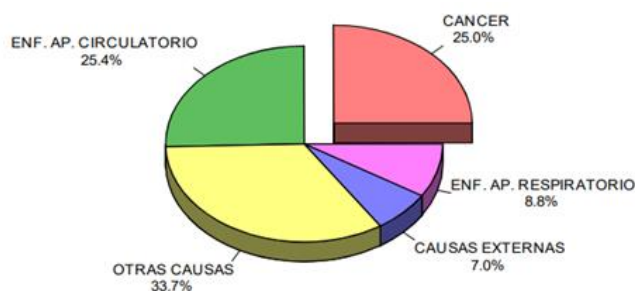


Figura 2. Células binucleadas sin micronúcleos, células binucleadas con un micronúcleo, células binucleadas con dos micronúcleos. (7)

Los biomarcadores dosimétricos se han utilizado de manera efectiva e intensiva durante mucho tiempo en el área de protección radiológica. Por el contrario, hasta la fecha no existen normas sólidas ni protocolos ampliamente aceptados para la aplicación de estos criterios de valoración en radioterapia, radiología diagnóstica e intervencionista y medicina nuclear. El Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) organizó la revisión de los datos disponibles sobre las posibilidades del uso de biomarcadores dosimétricos en escenarios de irradiación médica. El Informe Técnico resultante también contiene un resumen de los problemas identificados, lagunas en el conocimiento, limitaciones en la metodología y recomendaciones para su superación. Este trabajo proporcionó los antecedentes conceptuales para el inicio de un nuevo Proyecto de investigación coordinado E35010 del OIEA, MEDBIODOSE (2017-23), que tiene como objetivo específico el desarrollo y la mejora de aplicaciones de marcadores biodosimétricos en la práctica clínica en el cual participan laboratorios de 25 países, incluida la Unidad Académica en Radioprotección de la Facultad de Medicina del Laboratorio de Radiobiología de la Facultad de Medicina, que ha incorporado recientemente un sistema de análisis microscópico automatizado que permitirá un análisis rápido y preciso de los biomarcadores moleculares (9).

En términos de medicina personalizada, los biomarcadores son especialmente importantes para adaptar los propósitos del tratamiento del cáncer. Esto infiere un problema, ya que todos somos diferentes y no hay dos cánceres iguales. Existe una multitud de factores, entre ellos genéticos, epigenéticos e inflamatorios en juego dentro de cada tumor (10,11).

Dentro de la comunidad científica, ha sido de relevancia el estudio de la asociación entre la radioterapia y sus efectos adversos, debido al incremento de su utilización como pilar fundamental para el tratamiento de patologías oncológicas. El cáncer al día de hoy, se postula como problema de salud a nivel mundial; gracias al control de las enfermedades infecciosas, producto de los avances de la medicina en prevención, diagnóstico y tratamiento, así como también de las mejoras generales en la calidad de vida, la expectativa de vida ha tenido un aumento sustancial. Debido a esto, en la segunda mitad del siglo XX, emergió un nuevo perfil epidemiológico en el cual las enfermedades no transmisibles, especialmente las patologías cardiovasculares y el cáncer, se encuentran como primera causa de muerte (12). “El problema del cáncer es de notoria relevancia en el espectro epidemiológico del Uruguay, anualmente se registran unos 17.000 casos nuevos (unos 14.000 excluyendo al cáncer de piel no melanoma) y mueren más de 8.000 uruguayos por esta causa.” Según la información emitida por el Ministerio de Salud, “...las muertes por cáncer constituyen un cuarto (25%) del total de las defunciones registradas en Uruguay cada año (estas cifras corresponden al 2020...” – Figura 3) (13).



Fuente: Ministerio de Salud - Uruguay
<https://uins.msp.gub.uy/> - Accedido 28/04/2022

Figura 3. Esquema de la proporción de las muertes por cáncer en el Uruguay

Justificación

La importancia de la investigación de la radiosensibilidad individual en mujeres, radica en diferentes pilares fundamentales como lo son los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes y el uso frecuente de la radioterapia como tratamiento en una enfermedad sumamente prevalente a nivel poblacional y mundial, como lo es el cáncer.

El desarrollo de complicaciones inducidas por la radiación después de la radioterapia (RT) tiene un impacto significativo en el resultado del tratamiento y en la calidad de vida del paciente. En las últimas décadas la relación terapéutica ha mejorado debido a los avances en las tecnologías de RT y al uso de radioprotectores, mitigadores y radiosensibilizadores (14). Sin embargo, la toxicidad por radiación de los tejidos normales que rodean el tumor es un problema grave para el 5-10% de los pacientes que se ven afectados por una alta radiosensibilidad intrínseca (15–17). La evidencia de radiosensibilidad la dan las quemaduras in vivo y la radiodermitis en las partes del cuerpo irradiadas, junto con el efecto en el área vecina (18). Se estima que el 1% del total de pacientes radiosensibles pueden tener un compromiso en su pronóstico vital y se los denomina como pacientes hiper-respondedores (5). Varios factores, incluida la composición celular, la diferenciación, la capacidad de renovación celular y la radiosensibilidad celular, determinan la gravedad de la toxicidad de la radiación (19). Los factores vinculados con el paciente están profundamente relacionados con el riesgo de manifestar toxicidad por radiación y todavía no se dispone de marcadores biológicos fiables para predecir la aparición de efectos secundarios graves después de la RT. La respuesta humana a la radiación ionizante (IR) es individual y variable, y está influenciada por la edad, el tabaquismo, la diabetes, la enfermedad vascular del colágeno y el genotipo (20). Además, múltiples vías genéticas, como la reparación del daño del ADN, el estrés oxidativo, la fibrogénesis por radiación y el daño de las células endoteliales, están implicadas en las reacciones adversas de los tejidos después de la radioterapia (21). Sin embargo, la base molecular de la radiosensibilidad individual sigue sin comprenderse bien y la relación entre los diferentes indicadores de la sensibilidad a la radiación es aún limitada por lo que el estudio de las variantes genéticas asociadas a las diferencias interindividuales de la radiosensibilidad, ayuda a tomar medidas preventivas en los diferentes tratamientos radiantes (terapia personalizada) (1).

El diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad exigen una sólida comprensión de los mecanismos subyacentes. A lo largo de la historia, este esfuerzo por descifrar el origen y el mecanismo de transformación de una célula normal en cáncer ha llevado a varias teorías; desde una comprensión a nivel de heterogeneidad unicelular hay un importante número de desafíos moleculares para superar. Con una comprensión cada vez mayor de la genética y la biología del cáncer, la enfermedad se ha vuelto cada vez más compleja de entender. La complejidad del cáncer y conceptualización desde la biología es ampliamente aceptada y ha ayudado a avanzar en la terapéutica del cáncer al enfocarse en las diversas características pero, con el avance de las tecnologías, hay una mayor dispersión en la forma en que vemos el cáncer como una

enfermedad y la comprensión adicional durante la última década ha cambiado sustancialmente (22).

La dosis de radioterapia administrada se vincula con el control tumoral y la incidencia de complicaciones. Poder dosificar la radiosensibilidad, parámetro el cual es individual y varía entre cada paciente, nos permitirá optimizar las directivas de los tratamientos que requieran de radioterapia, especialmente los oncológicos, lo cual sería beneficioso para cumplir con el objetivo terapéutico y minimizar los efectos colaterales (6). Actualmente se sabe que la radiosensibilidad es diferente entre los sujetos, pero no hay estudios realizados sobre este tema en la población Uruguaya sin patología oncológica.

OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo General

Estudiar el nivel de radiosensibilidad en mujeres voluntarias de 20 a 40 años provenientes de Montevideo, Uruguay.

Objetivos Específicos

1. Estudiar la aparición espontánea de aberraciones cromosómicas en el grupo de linfocitos expuestos a un radiomimético in vitro, extraídos de sangre periférica de mujeres voluntarias.
2. Estudiar el nivel de radiosensibilidad a través del análisis de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos expuestos a un radiomimético in vitro, extraídos de sangre periférica de mujeres voluntarias.

METODOLOGÍA

Para este trabajo la población elegida fueron mujeres de 20 a 40 años de Montevideo Uruguay. Como criterios de inclusión se tomaron el sexo femenino y edad entre 20 a 40 años; como criterios de exclusión fumadoras, alcoholistas, enfermedad oncológica diagnosticada en curso y tratamiento oncológico en los últimos 10 años.

La muestra utilizada fue, sangre entera obtenida por venopunción mediante el procedimiento de rutina, de 8 donantes contactadas por miembros del equipo de investigación, entre mujeres de su entorno que accedieron voluntariamente y dieron su consentimiento informado luego de ser informadas sobre el proyecto de investigación.

DISEÑO DE ESTUDIO

Se eligió realizar un estudio experimental in vitro con ensayos controlados, con muestras de sangre periférica de mujeres voluntarias, no fumadoras, no alcoholistas, sin enfermedad oncológica diagnosticada en curso y que no hayan estado bajo tratamiento oncológico en los últimos 10 años. Las mismas se exponen a un radiomimético desde las 72 a 96 hs de iniciado el cultivo y recuperadas en presencia de 4 mM de cafeína, con el objetivo de conocer el grado de radiosensibilidad, para lo que se realizaron estudios en el marco del “Ensayo G2” empleando cafeína. (23)

Dado que la etapa G2, es la etapa del ciclo celular más radiosensible, han sido desarrollados ensayos que permiten evaluar el incremento de aberraciones cromosómicas tipo cromátida (23) adicionando cafeína al final del cultivo celular para liberar el bloqueo en G2 y permitir que las células dañadas lleguen a la mitosis para poder ser analizadas.

Ensayo G2: Se realizó un cultivo de sangre periférica en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) y fitohemaglutinina. A las 66-68 horas fueron expuestas al radiomimético. Luego se dividió el cultivo en dos tubos, a uno se le adicionó 200 microlitros de cafeína quedando una concentración final 4 mM y pasadas 8 horas se recolectó la muestra habiendo colocado 100 µL de Colcemid cuya concentración stock es de 10 µg/mL. Luego se realizaron preparaciones que fueron teñidas con el colorante fluorescente DAPI para su análisis microscópico (21).

DEFINICIONES ESPECÍFICAS DE EXPOSICIÓN Y RESULTADOS

Grupo control: linfocitos no expuestos a bleomicina in vitro, extraídos de sangre periférica de mujeres voluntarias.

Grupo tratado: linfocitos expuestos a bleomicina in vitro, extraídos de sangre periférica de mujeres voluntarias.

Técnicas para la recolección de datos

Microscopía óptica de epifluorescencia para analizar y contabilizar aberraciones cromosómicas de tipo cromátida teñidas con el fluorocromo DAPI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y procesamiento de muestras

2.1 Cultivo de linfocitos:

Se extraen 4 mL de sangre periférica en el Hospital de Clínicas, Montevideo Uruguay y se envían en tubos de heparina sódica de 10 mL, en condiciones ambientales, al laboratorio de Radiobiología del Dpto Biofísica de la Facultad de Medicina, donde se reciben una hora después de la extracción. Cada muestra de sangre se cultivó en 2 tubos diferentes, 1mL de sangre por tubo. A cada tubo se le agregó 9 mL de medio RPMI 1640, 1 mL de suero fetal bovino y 140 µL de fitohemaglutinina. Todas las muestras se dejaron en incubadora de CO₂ durante 72 hs.

2.2 Tratamiento:

Posterior a las 72 horas del cultivo, cada muestra se divide en 2, por lo que se cuenta con cuatro tubos: dos controles y dos tratados con bleomicina. Se agrega cafeína (100 mM, 1.942 g/100ml PBS, RT) a uno del grupo control y a uno del grupo tratado. Luego se detiene la mitosis en metafase utilizando 100 µL de colchicina en una concentración de 10 µg/mL.

2.3 Cosecha y preparación de extendidos:

Luego del tiempo de espera del tratamiento, se centrifuga y se retira sobrenadante para posteriormente dejarlo por 20 minutos a temperatura ambiente con KCl frío 0,075M, colocando luego 8 mL en cada tubo. Se realiza la prefijación, adicionando 2 mL de fijador universal (solución 3:1 - tres partes de metanol y una de ácido acético). Se centrifuga durante 10 minutos a 1200rpm, posteriormente se elimina el sobrenadante. Luego se vuelve a centrifugar y sacar sobrenadante. Se realizan tres fijaciones en total, repitiendo lo antes mencionado.

Para realizar el extendido celular, se limpia el portaobjetos con alcohol etílico al 70%, luego se coloca en un coplin con metanol al 70% para realizar los preparados. El siguiente paso es retirar el sobrenadante y con una pipeta Pasteur resuspender. Se toma una muestra y se coloca en un portaobjetos. A continuación, se flambea la muestra sobre un mechero y finalmente se etiqueta cada preparado y se deja secar.

2.4 Tinción:

Para la tinción de los preparados, se coloca DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a una concentración de 1,5 µg/mL sobre los portaobjetos, cubriéndolo posteriormente con un cubreobjetos.

3.Observación al microscopio:

Una vez obtenido el preparado se procede a visualizar las metafases mediante un microscopio de fluorescencia y el uso del sistema de análisis Metafer4, que identifica las metafases en las cuales se contabilizan las aberraciones cromosómicas de tipo cromátidas.

Plan de análisis

El análisis de las aberraciones cromosómicas de tipo cromátida implica la observación directa al microscopio óptico invertido de epifluorescencia. Se utilizó un equipamiento de análisis automatizado, *Metaphase Findern de MetaSystems*, con el objetivo de incrementar la sensibilidad del ensayo para la determinación de la radiosensibilidad.

Se estudia la radiosensibilidad mediante la visualización y el conteo de aberraciones cromosómicas, comparando los grupos a los que se les aplicó radiomiméticos sin cafeína con los grupos control correspondientes sin cafeína. Además, se comparan los grupos tratados y control con cafeína. Por otra parte, se realiza el cálculo del índice de radiosensibilidad por donante, el cual surge a partir de la siguiente fórmula (23):

$$IRS = \frac{TratadosSC}{TratadosCC} \times 100$$

Análisis estadístico

Una vez registrados los datos, se designan en las correspondientes tablas de grupos tratados y control (con y sin cafeína) y se analizan en el software *IBM SPSS Statistics*.

Se estudió la normalidad con la prueba Shapiro-Wilks adaptada a un tamaño de muestra de 8 donantes. Dado que los datos no siguen una distribución normal se utilizó un test no paramétrico de suma de rango, Wilcoxon, para muestras pareadas.

En cuanto a los gráficos comparativos por grupos, los mismos se realizaron en base al promedio de las aberraciones cromosómicas de cada donante ya que experimentalmente no se logró contabilizar el mismo número de metafases.

RESULTADOS:

Formación de aberraciones cromosómicas en grupo control y tratado sin cafeína.

Mediante la contabilización de aberraciones cromosómicas, se obtuvo la media para cada donante, siendo representadas en la *Figura 4* para los grupos expuestos y no expuestos a radiomiméticos sin cafeína.

Las medias de mayor valor se obtuvieron en los grupos tratados, obteniendo diferencias interindividuales.

El mínimo valor de media en el grupo control se observó en la donante 1, con una media de 0.04, mientras que el máximo valor dentro del mismo grupo, se encuentra en la donante 6 con una media de 0.66.

Por otra parte, el valor mínimo de media en el grupo tratado se observó en la donante 8, con una media de 0.56, mientras que el valor máximo se encontró en la donante 5 con una media de 1.94.

Se valoró la significancia estadística mediante un test no paramétrico y se identificó en la *Figura 4*, cuál de las donantes no presentó una diferencia estadísticamente significativa.

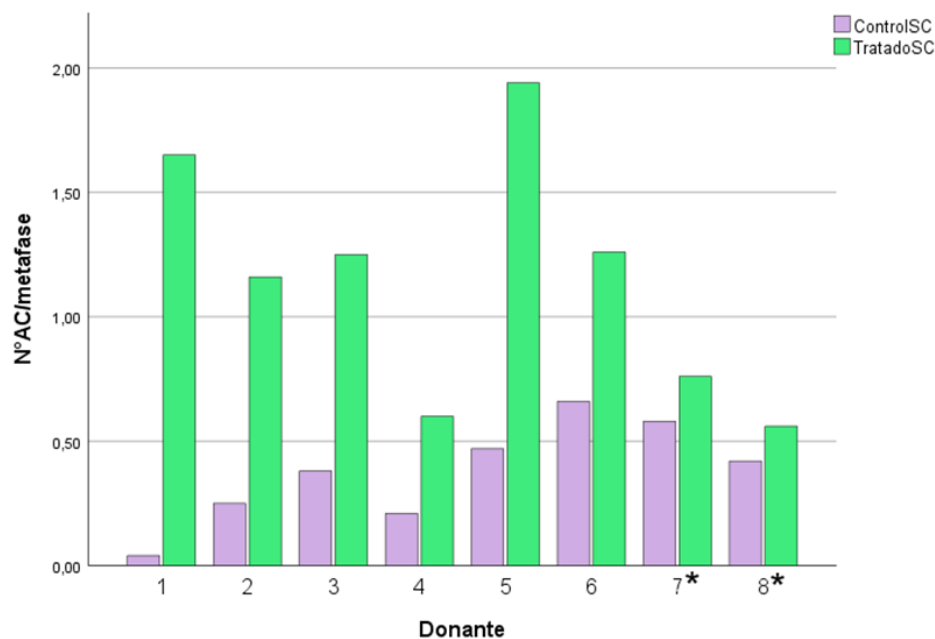


Figura 4. Análisis de medias de las aberraciones cromosómicas (AC) entre los grupos control y tratados sin cafeína (SC) por donante.
(*) no estadísticamente significativo.

Formación de aberraciones cromosómicas en grupo control y tratado con cafeína

Al igual que se detalló en el apartado anterior, se contabilizaron las aberraciones cromosómicas por metafase (*Figura 5*) para obtener la media de cada donante.

En la *Figura 6* se observó un aumento de la media en los grupos tratados en comparación con el control. Asimismo, las medias de ambos grupos son mayores que las mencionadas en el grupo anterior (grupos tratado y control sin cafeína).

El mínimo valor de media en el grupo control se observó en la donante 5 con un valor de 0.25, mientras que la media de valor máximo en el mismo grupo, se encuentra en la donante 6 con una media de 0.96.

Por otra parte, el valor mínimo de media en el grupo tratado se observó en la donante 8 con una media de 1.12, mientras que el valor máximo se encontró en la donante 5 con una media de 4.54.

Se utilizó un test no paramétrico que determinó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las donantes.

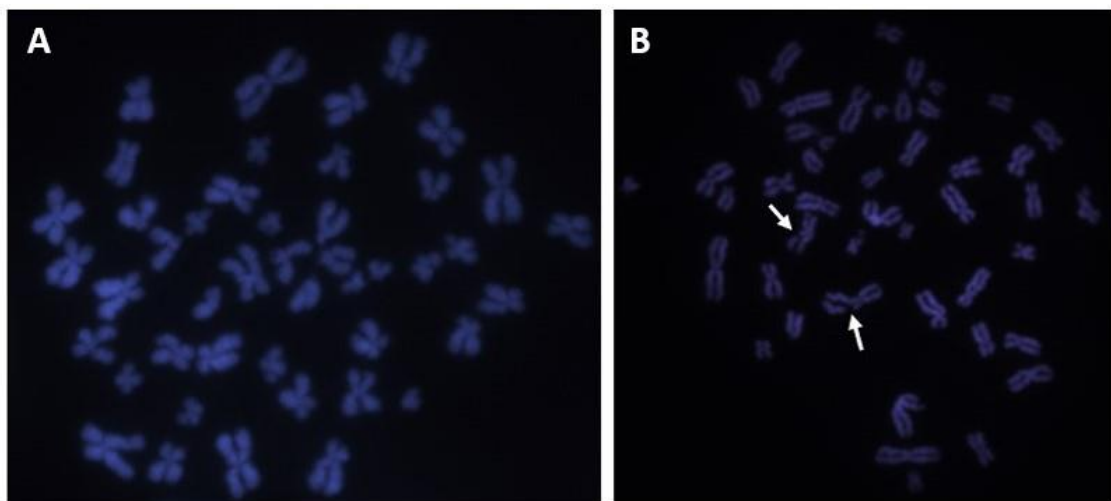


Figura 5. A. Metafase control con cafeína. **B.** Metafase expuesta a radiomiméticos con cafeína donde se observan aberraciones cromosómicas (flechas)

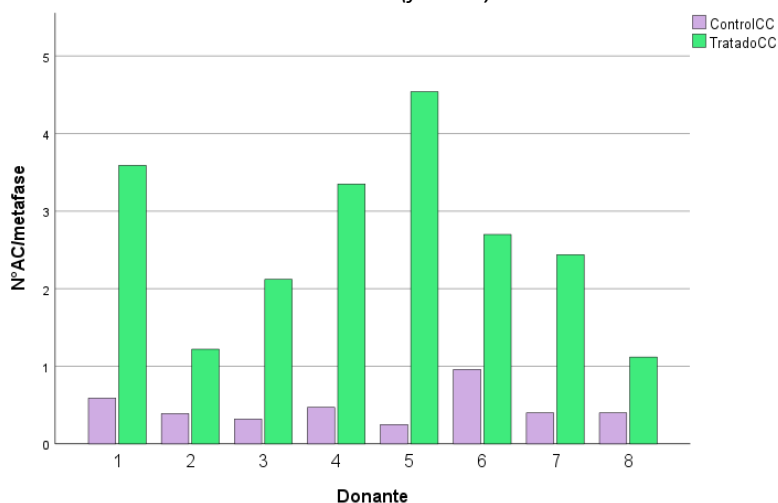


Figura 6. Análisis de medias de las aberraciones cromosómicas (AC) entre los grupos control y tratados con cafeína (CC) por donante.

Formación de aberraciones cromosómicas en grupo tratado sin cafeína y tratado con cafeína.

En la *Figura 7*, se representan los tratados con y sin cafeína. La diferencia de las apariciones de aberraciones cromosómicas se evidenció de forma tal que la media máxima del tratado con cafeína duplica el valor de la media máxima del tratado sin cafeína, correspondiendo a 4.54 y 1.94 respectivamente.

Por otra parte, se evidenció que las medias mínimas de los grupos tratados con y sin cafeína, también difieren, ya que las medias mínimas corresponden a 1.12 y 0.58 para los grupos tratados con cafeína y sin cafeína respectivamente.

Mediante el análisis estadístico se determinó de manera individual cuál de las donantes no tuvo una diferencia estadísticamente significativa entre sus propias muestras, esto se ilustra en la *Figura 7*.

Con el análisis estadístico se contrastaron los diferentes grupos y se comprobó que, para un alfa de 0.05, existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados.

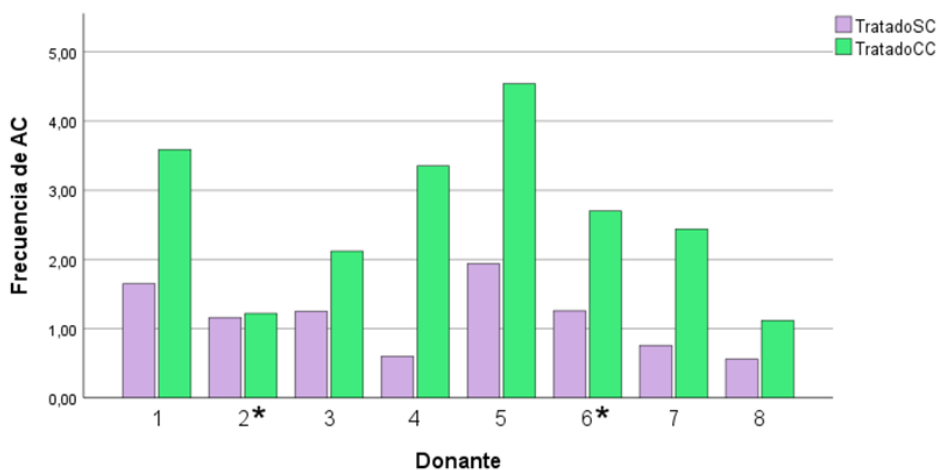


Figura 7. Análisis de frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) entre los grupos tratados sin (SS) y con cafeína (CC).
(*) no estadísticamente significativos.

Índice de radiosensibilidad.

Se utilizó el ensayo G2 (23) para estandarizar el cálculo de la radiosensibilidad individual y a partir de los datos obtenidos se calculó el Índice de Radiosensibilidad.

Sobre la base de la distribución observada de los resultados individuales, el índice de Radiosensibilidad medio fue de 48.63 (desvío estándar de 22.5). El índice de radiosensibilidad establece los siguientes parámetros; “radioresistente” (0-30%), “normal” (31-50%), “radiosensible” (51-70%) e “hiper radiosensible” (71-100%) según el ensayo estandarizado G2 (23). En el estudio se obtuvieron los siguientes resultados de las donantes: 1

hiper radiosensible, 1 radiosensible, 5 dentro del rango normal y 1 radioresistente (Figura 8). El porcentaje de donantes por grupo se observa en la Figura 9.

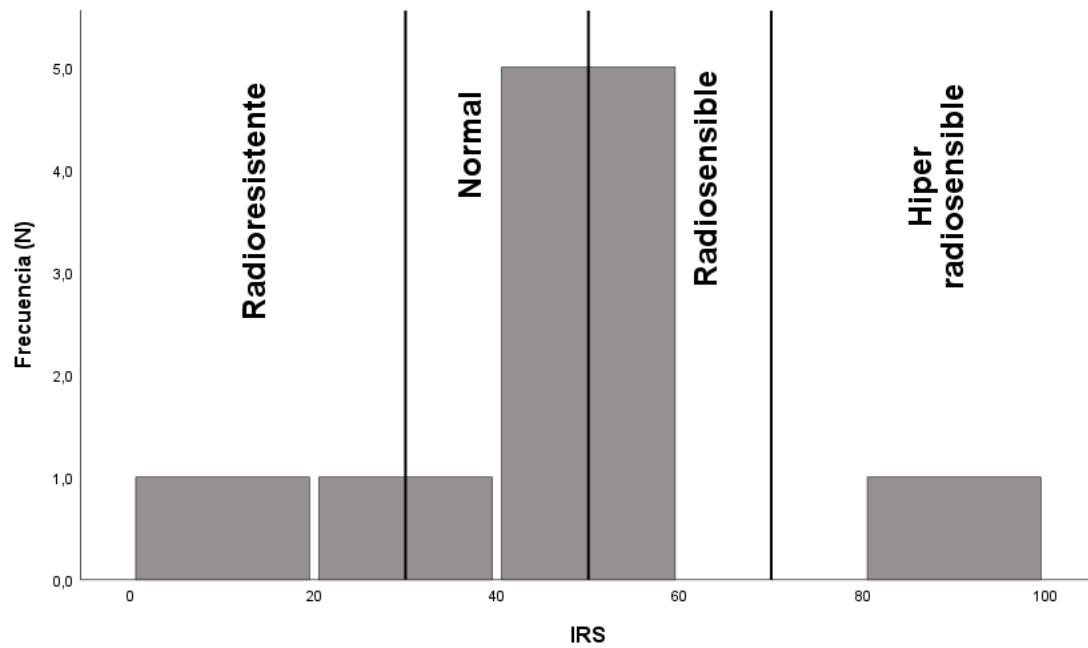


Figura 8. Distribución de datos para valores del Índice de Radiosensibilidad (IRS)

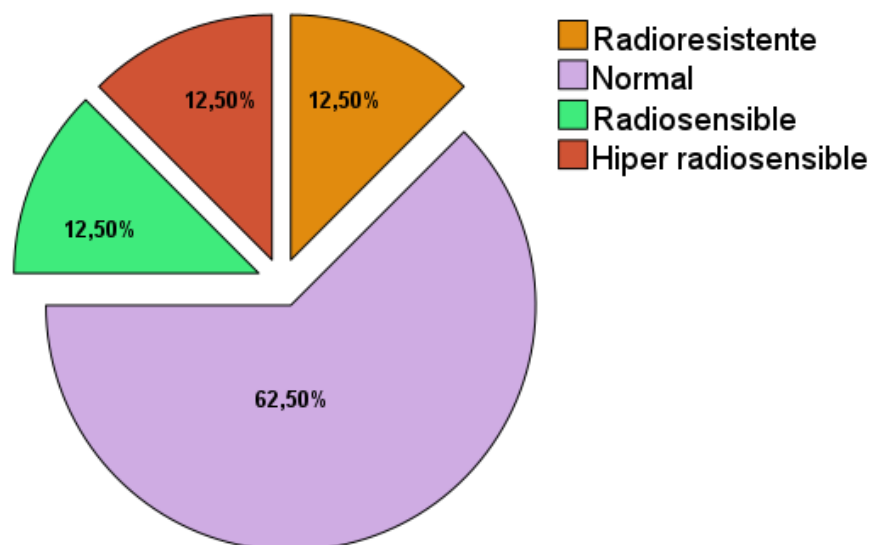


Figura 9. Distribución de donantes según las cuatro clases del IRS.

DISCUSIÓN:

Los datos de este estudio indican que la radiosensibilidad es comprobable y cuantificable mediante la intervención sobre el ciclo celular en el checkpoint de G2, con la consiguiente formación de aberraciones cromosómicas tras la exposición a un genotóxico de tipo radiomimético (Bleomicina). En relación al análisis de datos, se logra evidenciar que todas las muestras expuestas al radiomimético presentan mayor formación de aberraciones cromosómicas, en comparación con las no expuestas para cada donante. Es importante aclarar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la comparación de muestras sin cafeína en las donantes 7 y 8 (*Figura 4*); en el resto de las comparaciones sí se obtuvieron diferencias significativas. En base a esto podemos decir que se observan resultados acordes con la evidencia científica, la cual sostiene que la exposición a radiación es determinante de la formación de aberraciones cromosómicas (23).

Del análisis de datos de las muestras expuestas a radiomiméticos con y sin cafeína se evidencia que la exposición a cafeína permite la visualización de la formación de aberraciones cromosómicas al inhibir el checkpoint de G2, lo que se refleja en las medias de los grupos tratados. Esto se debe a que el ciclo celular no se detiene para realizar la reparación del daño inducido.

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de muestras tratadas con radiomiméticos con y sin cafeína para las donantes 2 y 6 (*Figura 7*), mientras que en el resto de las donantes sí se obtuvieron. Pese a esto, al comparar la diferencia del total de muestras expuestas con y sin cafeína sí fueron significativas, resultado acorde con el estudio del "G2-checkpoint abrogation in irradiated lymphocytes" (23).

La exposición a la radiación genera la doble rotura de la molécula de ADN y el conteo a nivel de rotura de cromátidas (hebra simple de ADN) evidencia el efecto del control interno que proporciona el punto de control de G2 al compararlo con el grupo expuesto a radiación sin la inhibición de G2 (24). Sin esta inhibición las células irradiadas pueden entrar en apoptosis, muerte celular o acumular mutaciones con posibilidad de desarrollo de neoplasia, resultados dependientes de los efectos biológicos estocásticos o probabilísticos de las radiaciones ionizantes (25).

Otros estudios como "*Individual Radiosensitivity in Oncological Patients: Linking Adverse Normal Tissue Reactions and Genetic Features*" revelaron la existencia de una relación entre la radiosensibilidad y cómo esta se ve influenciada por factores endógenos: edad, reparación del ADN, dieta y estilo de vida y factores exógenos: toxicidad de radiación clínica y aberraciones

cromosómicas. El estudio realiza énfasis en la relación entre la vía apoptótica y la toxicidad generada a partir de un ensayo de linfocitos T. Estas vías influyen en la sensibilidad a la quimioterapia y supervivencia celular, por lo cual este estudio revela otras implicancias dentro de la radiosensibilidad, como la expresión aumentada de tres genes, BBC3, FDXR y GADD45A, asociados a la vía apoptótica (11).

El gen ATM, juega un rol fundamental en la respuesta al daño del ADN, la apoptosis y en la supresión de tumores. Sin embargo cuando las células neoplásicas logran sortear este punto de control, la señalización de ATM puede conducir a la supervivencia del cáncer, la formación de metástasis y la quimio y radiorresistencia. (26)

La ataxia telangiectasia es una enfermedad causada por un cambio en el gen ATM lo cual lleva a una inestabilidad genómica que causa mayor sensibilidad al cáncer y mayor incidencia de radiosensibilidad (27), por ello dicha población ha sido sujeto de estudio en las investigaciones de este tema.

En relación al estudio del índice de radiosensibilidad de las muestras obtenidas, se observan diferencias en la radiosensibilidad de las donantes (*Figura 8*). Por lo que podemos demostrar la existencia de radiosensibilidad interindividual en las donantes del estudio ya que se observa un mayor porcentaje de muestras en el rango considerado "normal", comparando con los extremos, radiosensible o radiorresistente (*Figura 9*), lo que coincide con lo evidenciado en la literatura científica(23).

A su vez, la comparación de los conteos entre estos grupos, permite establecer el índice de radiosensibilidad individual, que establece que a mayor IRP (Parámetro Individual de Radiosensibilidad) mayor será la radiosensibilidad (24).

Limitaciones

Debido al tamaño de la muestra y que en varios casos los resultados no fueron estadísticamente significativos, éstos no pueden ser extrapolados a nivel poblacional, por lo que se sugiere la realización de otro estudio experimental con un tamaño de muestra mayor.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con este estudio experimental in vitro se evidenció que la exposición a un radiomimético (Bleomicina) aumenta la aparición de aberraciones cromosómicas de tipo cromátida en los linfocitos cultivados y que la frecuencia de aberraciones por célula es aún mayor en aquellos que presentan el checkpoint de G2 inhibido por la exposición a cafeína.

Mediante el estudio del nivel de radiosensibilidad, se logró catalogar a cada donante en una de las 4 categorías del índice de radiosensibilidad, comprobando la existencia de radiosensibilidad interindividual.

En función de estos resultados, sería importante realizar un estudio con una muestra representativa de la población Uruguaya para obtener datos que puedan extrapolarse estadísticamente.

Asimismo, los datos de un estudio mayor, podrían contribuir al desarrollo de un biomarcador o técnica de medición, que facilite la caracterización de personas radiosensibles en forma reproducible y accesible. Lograr esta herramienta citomolecular en los sistemas de salud, permitiría la valoración para la generación de pautas y esquemas de radiación en todas aquellas personas que por diferentes motivos se vean expuestas a radiaciones ionizantes; por ejemplo en la decisión de incluir la radioterapia para el tratamiento del cáncer o derivar a cirugía dependiendo del tipo de lesión y riesgo a la exposición de radiación. Con estas medidas se toma en cuenta la radioprotección en la población. Por otra parte, es de conocimiento la existencia de la relación entre la radiosensibilidad y la predisposición al cáncer, siendo de jerarquía la identificación de personas radiosensibles en la población (5).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez-López W, Hande MP. Health effects of exposure to ionizing radiation. *Advanced Security and Safeguarding in the Nuclear Power Industry: State of the art and future challenges*. 2020 Jan 1;81–97.
2. Foray N, Colin C, Bourguignon M. Radiosensibilité L'évidence d'un facteur individuel. *Medecine/Sciences*. 2013;29(4).
3. Radiosensibilidad. Diccionario médico. Clínica Universidad de Navarra. [Internet]. [cited 2022 Nov 12]. Available from: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/radiosensibilidad>
4. El-Nachef L, Al-Choboq J, Restier-Verlet J, Granzotto A, Berthel E, Sonzogni L, et al. Human radiosensitivity and radiosusceptibility: What are the differences? Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.
5. Sebastià Fabregat Dirigida por José Miguel Soriano del Castillo Dra Alegría Montoro Pastor N. Marcadores citogenéticos aplicados en biomedicina = Cytogenic biomarkers applied in biomedicine. 2013 [cited 2022 Nov 12]; Available from: <https://roderic.uv.es/handle/10550/27989>
6. Lusiyanthi Y, Surniyantoro HNE, Rahajeng N, Suvifan VA, Purnami S, Choridah L. The Cytogenetic Effects on Peripheral Blood Lymphocytes in Cancer Patients After Radiation Therapy: Chromosome Aberrations and Micronuclei. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*. 2021;13(1).
7. de Seguridad N, Oiea D. NORMAS DE SEGURIDAD DEL OIEA Y PUBLICACIONES CONEXAS. [cited 2022 Nov 12]; Available from: <http://www-ns.iaea.org/standards/>
8. Lobo TM, Bolaños A. Micronúcleos: Biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Salus*. 2014;18(2).
9. Vinnikov V, Belyakov O. CLINICAL APPLICATIONS OF BIOMARKERS OF RADIATION EXPOSURE: LIMITATIONS AND POSSIBLE SOLUTIONS THROUGH COORDINATED RESEARCH. In: *Radiation Protection Dosimetry*. 2019.
10. Rutten EA, Badie C. Radiation biomarkers: Silver bullet, or wild goose chase? Vol. 11, *Journal of Personalized Medicine*. 2021.
11. Palumbo E, Piotto C, Calura E, Fasanaro E, Groff E, Busato F, et al. Individual Radiosensitivity in Oncological Patients: Linking Adverse Normal Tissue Reactions and Genetic Features. *Front Oncol* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2022 Nov 13];9:987. Available from: [/pmc/articles/PMC6779824/](https://pmc/articles/PMC6779824/)
12. Barrios E, Garau M. Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2017;4(1).
13. Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer - Mayo 2022 [Internet]. [cited 2022 Nov 12]. Available from: <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/Situacion-Epidemiologica-del-Uruguay-en-relacion-al-Cancer--Mayo-2022-uc108>
14. de Ruyscher D, Niedermann G, Burnet NG, Siva S, Lee AWM, Hegi-Johnson F. Radiotherapy toxicity. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1).
15. Burnet NG, Johansen J, Turesson I, Nyman J, Peacock JH. Describing patients' normal tissue reactions: Concerning the possibility of individualising radiotherapy dose

- prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. *Int J Cancer*. 1998;79(6).
16. Azria D, Lapierre A, Gourgou S, de Ruysscher D, Colinge J, Lambin P, et al. Data-based radiation oncology: Design of clinical trials in the toxicity biomarkers era. Vol. 7, *Frontiers in Oncology*. 2017.
 17. Rieger KE, Hong WJ, Tusher VG, Tang J, Tibshirani R, Chu G. Toxicity from radiation therapy associated with abnormal transcriptional responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(17).
 18. Foray N, Colin C, Bourguignon M. 100 Years of individual radiosensitivity: How we have forgotten the evidence. Vol. 264, *Radiology*. 2012.
 19. Clarke González Y, Sasaki RM, Alexakhin L-E, Holm C, Streffer JD, Boice jr FA, Mettler jr A, Sugier RA, Holm J-K, Lee Sasaki JD, Boice jr H, Menzel L e Y, Pentreath Sugier AJ, González RJ, Preston RA. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP publication 103. *Ann ICRP*. 2007;37(2–4):1–332.
 20. Human Radiosensitivity Report of the independent Advisory Group on Ionising Radiation.
 21. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition*. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition. 2011.
 22. Senga SS, Grose RP. Hallmarks of cancer—the new testament. Vol. 11, *Open Biology*. 2021.
 23. Pantelias GE, Terzoudi GI. A standardized G2-assay for the prediction of individual radiosensitivity. *Radiother Oncol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2022 Nov 14];101(1):28–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22014898/>
 24. GI T, VI H, K B, KN M, C S, P A, et al. G2-checkpoint abrogation in irradiated lymphocytes: A new cytogenetic approach to assess individual radiosensitivity and predisposition to cancer. *Int J Oncol* [Internet]. 2009 Sep 15 [cited 2022 Nov 14];35(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19787278/>
 25. Olga Lillo Cressatti. *Biofísica de radiaciones ionizantes. Aplicaciones en Medicina*. Oficina del Libro FEFMUR, editor. Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR; 2012.
 26. Phan LM, Rezaeian AH. ATM: Main Features, Signaling Pathways, and Its Diverse Roles in DNA Damage Response, Tumor Suppression, and Cancer Development. *Genes (Basel)* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2022 Nov 14];12(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34070860/>
 27. Rothblum-Oviatt C, Wright J, Lefton-Greif MA, McGrath-Morrow SA, Crawford TO, Lederman HM. Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2016 Nov 25 [cited 2022 Nov 14];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27884168/>

AGRADECIMIENTOS

" El aprendizaje es experiencia, todo lo demás es información" Albert Einstein.

Agradecemos al Profesor Titular Dr. PhD. Gonzalo Ferreira, responsable del Departamento de Biofísica de Facultad de Medicina, UdelaR y en especial al equipo del Laboratorio de Radiobiología, destacando al Prof. Adj. Nelson Bracesco y al Investigador Asociado Búrix Mechoso, quienes desde un principio se mostraron en completa disposición y nos brindaron una cálida bienvenida, acompañándonos durante todo el proceso de esta investigación. Gracias por compartir su conocimiento teórico científico y experiencias en el laboratorio, porque de la teoría a la práctica hay un gran camino por recorrer.

Por último queremos agradecer a todas aquellas personas, que de manera directa o indirecta contribuyeron al desarrollo de esta investigación y a nuestro proceso de aprendizaje.

ANEXOS

Anexo 1

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONANTES

TÍTULO: Estudios de radiosensibilidad en linfocitos de mujeres de 20 a 40 años de Montevideo, Uruguay.

RESPONSABLE:

TUTORES:

Este formulario de consentimiento le brindará información detallada sobre las características del estudio, que además le será explicado por los participantes del equipo de trabajo. Usted deberá comprender el propósito del estudio, consultando todas las dudas que le surjan, para formarse una opinión propia y tomar la decisión de participar o no. Recuerde que, aun cuando decida participar, puede retirarse del estudio en el momento que usted desee, sin necesidad de dar explicaciones y no tendrá prejuicios ni consecuencias de ningún tipo.

OBJETIVOS DEL PRESENTE ESTUDIO

El presente estudio, tiene como objetivo estudiar el nivel de radiosensibilidad en mujeres voluntarias de 20 a 40 años provenientes de Montevideo, Uruguay.

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

La radiosensibilidad es la respuesta de un sistema biológico al exponerse a la radiación. En los seres humanos se han observado variaciones en la frecuencia y severidad de los efectos que presentan tras la exposición; esto se debe a diferencias individuales en su radiosensibilidad.

El presente estudio, en el que se le propone participar, se evaluará desde el punto de vista biológico el efecto de las radiaciones ionizantes sobre un tipo de sus células sanguíneas, los linfocitos.

Extracción de la muestra de sangre

Si decide participar, deberá proporcionar una muestra de 4 mL de sangre periférica que será obtenida mediante punción venosa en condiciones de seguridad y por personal calificado en el Hospital de Clínicas.

Cabe destacar que el procedimiento de extracción no incrementará el riesgo habitual que ocasiona la toma de muestras sanguíneas durante un procedimiento de rutina, salvo algún sangrado mínimo o formación de pequeño hematoma en la zona de punción.

Asimismo, se recogerán datos sobre su edad, antecedentes de tabaquismo, consumo de alcohol y antecedentes de enfermedad oncológica (cáncer) que esté actualmente diagnosticada o haya estado en tratamiento en los últimos 10 años

MANEJO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS y estudios de Radiosensibilidad

Las muestras extraídas serán utilizadas exclusivamente con los fines de esta investigación. Las mismas serán utilizadas en su totalidad, por lo cual, no se almacenarán luego de realizado el estudio de radiosensibilidad. Dicho estudio se realizará en el Laboratorio de Radiobiología de la Facultad de Medicina, UDELAR

BENEFICIOS

El desarrollo del proyecto se enmarca dentro de una actividad de formación de profesionales de la salud que completan destrezas de amplia utilidad para desarrollar su trabajo en toda la comunidad.

Se busca conocer la susceptibilidad individual frente a la acción de radiaciones ionizantes y de ese modo minimizar efectos adversos no deseados en una población de pacientes que eventualmente reciban radioterapia.

COMITÉ DE REVISIÓN INSTITUCIONAL

El Comité de Ética de la Facultad de Medicina, UDELAR, ha revisado este proyecto de investigación y aprobado su realización con fecha a determinar luego de la aprobación por el CEI de la Facultad de Medicina.

CONFIDENCIALIDAD DE LOS REGISTROS

Mantendremos en forma confidencial toda información sobre su persona. Las muestras de sangre serán analizadas de manera anónima. La información será utilizada de manera responsable y solamente será conocida por los investigadores del presente estudio, garantizando la confidencialidad de los mismos.

PREGUNTAS RELACIONADAS CON EL ESTUDIO

Por dudas respecto de la investigación o su participación en el presente estudio, usted podrá comunicarse con los responsables. También le proporcionamos el nombre y las referencias para comunicarse con un integrante del equipo de investigación: Búrix Mechoso, Tel.: xxx xxx xxx

DERECHO A NEGARSE O RETIRARSE

Su participación en este estudio es voluntaria. Usted tiene derecho a negarse a participar, sin que ello implique perjuicio alguno para su persona. Si decide participar en el estudio y más adelante cambia de opinión, tiene derecho a retirarse cuando lo desee sin necesidad de explicar sus motivos.

Resultados de la investigación y derechos

Los resultados del estudio serán compartidos mediante publicaciones, congresos, etc., siempre manteniendo el anonimato de todos los participantes. Antes de hacerlos públicos, se compartirán con los participantes, siempre y cuando éstos lo consientan.

Ud. tiene derecho a conocer los resultados del estudio de radiosensibilidad, para lo cual debe manifestar su voluntad de recibirlos.

CONSENTIMIENTO DE LA DONANTE

Al firmar abajo reconozco que:

- He leído este documento en su totalidad. Se me ha brindado la oportunidad de formular preguntas y conversar sobre los distintos aspectos del proyecto de Investigación.
- Estoy de acuerdo en proporcionar los datos solicitados, donar una muestra de sangre y permitir utilizar datos anónimos sobre mi persona que puedan ser de ayuda a la investigación propuesta.
- Me puedo retirar en cualquier momento en que yo lo decida, sin tener que dar ninguna explicación y solicitar que mis datos o mis muestras sean destruidos.
- De forma libre y voluntaria otorgo mi consentimiento para participar en la presente investigación

Deseo participar en el estudio _____

Nombre del participante: _____

Firma

CI: _____

Firma y aclaración de firma del Testigo _____

CI: _____

Fecha: _____

Firma y aclaración de firma del participante del equipo de investigación:

CI: _____

Fecha: _____