



LABORATORIO DE RADIOPATOLOGÍA DE LA AUTORIDAD REGULATORIA NUCLEAR

Cristina E. Gallegos, Diana Dubner y Severino Michelin

Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN)
Centro Atómico de Ezeiza
Presbítero Juan González y Aragón Nro.15 (CP: B1802AYA)
Buenos Aires- Argentina
cgallegos@arn.gob.ar

ABSTRACT

El laboratorio de Radiopatología (LRP) de la Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN) brinda soporte científico-técnico en caso de sobreexposición accidental o incidental a las radiaciones ionizantes.

Actualmente cuenta con procedimientos de indicadores evolutivos para el seguimiento y evaluación de pacientes con irradiación corporal total.

Debido al carácter multidisciplinario de la respuesta a los efectos de las radiaciones, el LRP desarrolla además proyectos de Investigación y Desarrollo.

Uno de ellos está dirigido al estudio fisiopatológico y terapéutico de las irradiaciones localizadas. En el marco del convenio Hospital de Quemados de la Ciudad de Buenos Aires-ARN, el LRP participa en un protocolo de diagnóstico y tratamiento a través del estudio de marcadores de inflamación para el seguimiento evolutivo de pacientes con Síndrome Cutáneo Radioinducido y su respuesta a los tratamientos terapéuticos.

Dado que el ICRP realizó recientemente una revisión de la dosis umbral para opacidad en cristalino y del límite de dosis ocupacional en cristalino basándose en estudios que sugieren una mayor radiosensibilidad que la previamente considerada, desarrollamos un proyecto de relevamiento y evaluación de dosis en cristalino, en correlación con estudios oftalmológicos en trabajadores ocupacionalmente expuestos. Respecto del efecto de bajas dosis, el LRP ha realizado estudios de efectos a muy bajas tasas de dosis *in vitro* y estudia la aplicación de modelos de estimación de riesgos de efectos estocásticos.

Finalmente, el LRP participa activamente en tareas de capacitación y entrenamiento de profesionales y personal técnico de las distintas áreas radiológicas y nucleares así como del Programa de Protección Radiológica del Paciente.

1. INTRODUCCIÓN

Los objetivos del laboratorio de Radiopatología (LRP) de la Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN) están enfocados a la necesidad de dar soporte científico-técnico, mediante la actualización del conocimiento y el desarrollo e implementación de las herramientas necesarias, para la respuesta a la sobreexposición accidental o incidental a radiaciones ionizantes.

Ante los desafíos planteados por el carácter multidisciplinario de la respuesta a los efectos de las radiaciones, el LRP desarrolla diversas tareas y proyectos para abordar satisfactoriamente dicha respuesta.

De esta manera, el LRP cuenta actualmente con procedimientos de indicadores evolutivos para el seguimiento y evaluación de pacientes con irradiación corporal total (ICT). También se llevan a cabo proyectos de Investigación y Desarrollo, tales como el estudio de marcadores de inflamación para el seguimiento evolutivo de pacientes con Síndrome Cutáneo Radioinducido (SCR), un proyecto de relevamiento y evaluación de dosis en cristalino, en correlación con estudios oftalmológicos en trabajadores ocupacionalmente expuestos, así como el estudio del efecto de bajas dosis y muy bajas tasas de dosis en sistemas celulares *in vitro*. Por otra parte, el LRP participa también activamente en tareas de capacitación y entrenamiento de profesionales y personal técnico de las distintas áreas radiológicas y nucleares, incluyendo la protección radiológica del paciente.

2. ACTIVIDADES

2.1. Indicadores Evolutivos para el seguimiento y evaluación de pacientes con ICT

La medición de lipoperóxidos plasmáticos (LP) y del índice de madurez reticulocitaria (IMR) son utilizados como una herramienta para evaluar el grado de evolución de aquellos pacientes sometidos a ICT.

El IMR se basa en el análisis por citometría de flujo de poblaciones reticulocitarias de sangre periférica a través de la correlación entre la intensidad de fluorescencia obtenida con un colorante específico (naranja de tiazol) y el contenido de ácido ribonucleico (RNA), definiendo poblaciones de baja, media y alta fluorescencia. La presencia de reticulocitos de alta fluorescencia puede ser considerada como una expresión temprana de actividad eritropoyética, y ésta un indicador de la actividad hematopoyética global [1, 2].

En un estudio de 27 pacientes sometidos a ICT como condicionamiento para el trasplante de médula ósea se observó que el corrimiento hacia la región de alta fluorescencia a partir de reticulocitos con alto contenido de RNA y verificado a través del IMR, antecede de modo significativo al método convencional de recuento manual o automatizado de reticulocitos totales, neutrófilos y plaquetas en sangre periférica [3], constituyéndose en un método cuantitativo y de fácil implementación para la detección temprana de reactivación de la médula ósea.

Numerosos estudios han señalado a la producción de radicales libres como el principal mecanismo de daño radioinducido en los sistemas biológicos. Estos radicales libres son especies altamente reactivas que conducen al estrés oxidativo en los tejidos afectados. La peroxidación lipídica es un mecanismo de daño celular que se presenta cuando existe estrés oxidativo, y se ha demostrado puede resultar de utilidad como indicador de la evolución de pacientes sometidos a ICT. En un estudio de 27 pacientes sometidos a ICT como condicionamiento para el trasplante de médula ósea se observó que el incremento de LP durante las primeras dos semanas post-trasplante fue un predictor de evolución no favorable.

Los pacientes con evolución favorable, en cambio, revelaron un incremento de LP durante el condicionamiento, y un descenso significativo durante la tercera y cuarta semana post-trasplante con respecto a los valores pre condicionamiento [3].

El contenido de productos de lipoperoxidación se mide como sustancias reactantes con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo a la técnica de Jentzch et al. [4]. La misma se basa en la reactividad del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malondialdehído (MDA), un producto de la degradación lipoperoxidativa. El resultado se expresa como equivalentes de MDA en $\mu\text{moles/L}$.

El seguimiento de la concentración plasmática de LP puede ser una herramienta útil en el complejo seguimiento de pacientes sobreexposados.

2.2 Marcadores de inflamación para el seguimiento evolutivo de pacientes con Síndrome Cutáneo Radioinducido

EL LRP forma parte del Comité de Radiopatología del Hospital de Quemados de la Ciudad de Buenos Aires, participando en un protocolo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de lesiones localizadas radioinducidas, debidas a tratamientos radiantes, procedimientos intervencionistas y accidentes radiológicos.

Los efectos tardíos pueden tener efectos devastadores en la calidad de vida de las personas expuestas a radiaciones, ya sea en forma accidental o por tratamientos terapéuticos. Aunque se han sugerido numerosas etiologías para estas toxicidades tardías, los parámetros inflamatorios implicados durante la fase tardía son poco conocidos.

En el marco del convenio con el Hospital de Quemados se realizó un estudio con 25 pacientes que presentaban lesiones agudas y tardías de la piel luego de radioterapia o procedimientos de fluoroscopia intervencionista y se analizó la respuesta del sistema inmune en estos pacientes. Para ello se evaluaron por citometría de flujo la expresión de las moléculas de adhesión ICAM1 y β 1-integrina en granulocitos y linfocitos, así como cambios en subpoblaciones de linfocitos T (relación $T(CD4+) / T(CD8+)$)[5]. Los niveles de proteína C reactiva (PCR), un conocido marcador de inflamación, fueron cuantificados mediante ensayo inmunoturbidimétrico. El análisis de la expresión de las moléculas de adhesión reveló una mayor expresión de β 1-integrina en los linfocitos de los pacientes en comparación con controles no expuestos. También se observó una disminución en su expresión en el seguimiento de pacientes con buena respuesta al tratamiento terapéutico. Además, los pacientes con mala evolución mostraron una tendencia a la disminución de la relación $T(CD4+) / T(CD8+)$ en comparación con pacientes con buena evolución.

Los niveles de PCR fueron mayores en los pacientes de fase aguda y en pacientes con toxicidad tardía pero en crisis de exacerbación.

Los parámetros analizados en combinación con otros indicadores de inflamación, podrían ser utilizados como potenciales marcadores para el seguimiento del proceso de inflamación crónica radioinducida así como disponer de un mayor conocimiento de los factores biológicos involucrados en la respuesta de los tejidos normales en escenarios de exposición radiológica accidental, permitiendo aportar información adicional al médico tratante para guiar el tratamiento terapéutico en forma personalizada.

2.3 Evaluación de las dosis en el cristalino de los trabajadores ocupacionalmente expuestos en prácticas reguladas por la ARN

El cristalino es uno de los órganos más sensibles a las radiaciones ionizantes y esto ha sido documentado desde comienzos del siglo XX [6]. Estudios posteriores establecieron que la exposición a las radiaciones ionizantes conduce a la formación de cataratas [7]. El período de latencia y la severidad de los efectos dependen de la edad y del género y con respecto a las radiaciones ionizantes, son dependientes de la dosis, la tasa de dosis y del fraccionamiento.

Luego de la exposición a la radiación, el comienzo de la opacidad puede demorar desde algunos meses hasta más de 20 años antes de manifestarse como cataratas detectables clínicamente [8].

Aunque la sensibilidad del cristalino a altas dosis de radiaciones ionizantes es bien conocida, aún existe cierta incertidumbre acerca de la relación entre la dosis de radiación y las cataratas a bajas dosis y tasas de dosis.

En los años 90, las normas de protección radiológica sugeridas por el National Council on Radiation Protection and Measurements [9] y la International Commission on Radiological Protection [10] se basaban en la presunción de que las cataratas son un efecto inducido por la radiación, de tipo determinístico y que aparecen solo si se supera un cierto umbral de dosis. Según la ICRP Publicación 103 [11], hasta el año 2010, el umbral de dosis absorbida para inducción de cataratas en trabajadores ocupacionalmente expuestos, estaba comprendida entre 0,5 y 2 Gy para una exposición aguda y era de 5 Gy para una exposición crónica. Los límites de dosis equivalente en cristalino para trabajadores, se mantenían en 150 mSv/año y para público en 15 mSv/año. Sin embargo, estudios epidemiológicos recientes han suscitado dudas sobre estos valores [12]. Estos estudios junto con los experimentales, parecen indicar la aparición de cataratas con dosis de radiación muy inferiores a los umbrales vigentes y sugieren un mecanismo, posiblemente sin umbral, por lo tanto estocástico [13, 14, 15]. Teniendo en cuenta las nuevas evidencias epidemiológicas la ICRP sugiere actualmente un valor de umbral superior de 0,5 Gy en lugar de los 2 Gy anteriores para una exposición aguda y como límite de dosis para los trabajadores, recomienda una dosis equivalente de 20 mSv/año en promedio y no más de 50 mSv en un año [16]. Un valor similar de umbral fue propuesto por el German Radiation Protection Board (SSK) en su documento N° 234 [17].

Considerando estos nuevos valores de umbral propuestos por la ICRP 2011, se está desarrollando un proyecto para la determinación de dosis en cristalino en los trabajadores ocupacionalmente expuestos.

En el marco de dicho proyecto, se identificaron posibles escenarios de interés regulados por la Autoridad Regulatoria Nuclear como ser:

- Empresa de Fabricación de Combustibles Nucleares
- Ciclotrón de producción de Radiofármacos

Se ha iniciado un programa de mediciones utilizando dosímetros personales y ambientales con detectores termoluminiscentes (TLD) modelo 700H y mediciones de tasa de fluencia beta y gama

con detectores de campo y sondas tipo Automess modelo AD 17 (con y sin filtro). Las mediciones pasivas con TLD están en proceso de evaluación.

A partir de las mediciones de tasa de fluencia beta, la tasa de dosis beta fue calculada aplicando los factores dosimétricos publicados por Behrens and Dietze [18]. A la fecha se ha podido comprobar la eficacia de las lentes protectoras pues disminuyen la dosis beta en aproximadamente 2/3 para campos representativos de elementos combustibles. La tasa de dosis gamma es entre 15 y 20 veces menor (Ref. A. Discacciatti, comunicación interna)

En el Ciclotrón se realizaron mediciones en cristalino durante el cambio de ventana del blanco, los valores de dosis del campo mixto (beta + gama) fueron menores a 260 μ Sv por práctica, siendo el 95% de la dosis debida a radiación gamma y el 5% a radiación beta. (Ref. F. Andrada comunicación interna) Considerando que esta práctica podría llegar a realizarse como máximo 3 veces por año, los valores de dosis en cristalino no superarían el nuevo límite recomendado por la ICRP 2011.

2.4 Estudio del efecto de bajas dosis y muy bajas tasas de dosis en sistemas celulares *in Vitro*

Se estudió el efecto de la irradiación beta con bajas tasas de dosis sobre células en cultivo. Para ello desarrollamos un dispositivo simple y económico para irradiación beta externa con ^{32}P . Se utilizó una línea celular de melanoma humano la cual fue continuamente irradiada con ^{32}P con una tasa de dosis inicial de 15 mGy/h hasta alcanzar una dosis final de 2 Gy, y se determinó la fracción de sobrevivencia en las condiciones control e irradiadas. Se determinó aproximadamente un 40% de disminución en la sobrevivencia celular bajo estas condiciones experimentales.

Con el propósito de determinar los posibles mecanismos de muerte celular implicados, se evaluaron el ciclo celular y los niveles de apoptosis bajo estas condiciones experimentales. Se observó un arresto progresivo en la fase G2/M del ciclo celular, acompañado por un incremento en los niveles de apoptosis. Además se demostró la existencia de efecto bystander.

Se compararon estos resultados con aquellos obtenidos luego de irradiación gamma con una tasa de dosis de 30.000 mGy/h, con una dosis final de 2 Gy, obteniendo resultados similares en los valores de frecuencia de sobrevivencia.

De esta manera, los resultados obtenidos indicarían que la irradiación con muy bajas tasas de dosis beta sería tan efectiva como la irradiación con altas tasas de dosis gamma para inducir muerte celular en la línea celular M8 de melanoma humano.

Estas observaciones serán de particular interés en para la optimización de los protocolos de radioterapia y radioinmunoterapia.

2.5 Tareas de Capacitación

La evolución de la Protección Radiológica ha sido motorizada por dos factores: la información sobre los efectos de la radiación en los sistemas biológicos y los cambios de actitudes del hombre con respecto a los riesgos aceptables.

La educación y el entrenamiento del personal involucrado son esenciales para asegurar la mejor protección radiológica ocupacional, del público y de los pacientes y con ese fin el LRP participa en cursos, entrenamientos, seminarios, enfocados a diferentes tipos de audiencia a nivel local y regional.

Se mencionan a continuación algunos de ellos:

- Curso regional de posgrado sobre protección radiológica y seguridad en el uso de las fuentes de radiación (International Atomic Energy Agency, (IAEA); ARN; Universidad de Buenos Aires (UBA)).
- Cursos anuales de formación y actualización para el personal de las centrales nucleares (Comisión Nacional de Energía Atómica, (CNEA); ARN).
- Cursos de actualización en seguridad radiológica de operadores de equipos de medición industrial y para el uso de radiotrazadores en aplicaciones petroleras y perfilaje de pozos (ARN; Sociedad Argentina de Radioprotección, (SAR)).
- Módulo de protección radiológica en la Carrera de Especialización en Radioquímica y Aplicaciones Nucleares (CNEA; Univ. de San Martín, (UNSAM)).
- Con respecto a las actividades relacionadas con la Protección al Paciente, el número creciente de prácticas médicas involucrando radiaciones ionizantes y la mayor tecnología asociada a las mismas, obliga a maximizar la divulgación de los principios de protección radiológica para disminuir sobreexposiciones y riesgos asociados. Para ello se promueve la participación activa de la comunidad médica, mediante cursos, jornadas y encuentros

dirigidos a médicos, radiólogos, físicos médicos, tecnólogos, enfermeras, radiofarmacéuticos, etc., realizados mayormente en hospitales y centros de atención para facilitar su concurrencia.

3. CONCLUSIONES

Con las actividades y desarrollos descriptos el LRP cumple con los objetivos propuestos, respondiendo a las necesidades actuales de cumplimiento de niveles apropiados de protección de las personas y los criterios regulatorios en la seguridad radiológica y nuclear, así como a desafíos futuros que la rápida evolución de nuevas prácticas radiológicas permite prever.

REFERENCIAS

1. Dalal BI, Stockford GR, Naiman SC, Spinelli JJ, Phillips GL. "Criteria for marrow engraftment: **comparison of reticulocyte maturity index with conventional parameters.**" *Bone Marrow Transplant.* **17**, 91-92 (1996).
2. Kakiuchi S., Kobayshi M., Satomi Y. et al " **Flow cytometric analysis of erythropoietic abnormality: changes in the cell maturity index of reticulocytes and retic distribution index are useful as indicator of erythropoietic toxicity in non-clinical studies**" *J Toxicol Sci.***31**, 111-122 (2006).
3. Dubner D, Pérez Mdel R, Barboza M, Sorrentino M, Robinson A, Gisone P. Evolutionary and bone marrow recovery indicators in bone marrow transplantation after total body irradiation." *Medicina.* **62**, 555-561(2002).
4. Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK "Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids". *Free Radic Biol Med.* **20**, 251-256 (1996).
5. Scherthan, H.; Abend, M.; Muller, K et al. "Radiation -Induced Late Effects in Two Affected Individuals of the Lilo Radiation Accident." *Rad Res* **167**, 615-623 (2007).
6. Rohrschneider W. "Studies on the formation and the morphology of Rontgen-radiation cataract in humans "(In german) *Arche. F. Augenh.* **106**, 221-254 (1932).
7. Otake, M. and W. J. Schull. "A review of forty-five years study of Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivors. Radiation Cataract." *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, **32**, 283-293 (1991).
8. Wilde, G. and J. Sjostrand. "A clinical study of radiation cataract formation in adult liffollowing γ irradiation of the lens in early childhood" *Br. J. Ophthalmol.* **81**, 261-266 (1997).
9. NCRP. Report 116. Bethesda, MD: National Council on Radiation Protection and Measurements; 1993. Limitation of exposure to ionizing radiation.
10. ICRP. Publication 60. Oxford: Pergamon Press; (1991). The 1991 Recommendations of International Commission on Radiological Protection.

11. ICRP Publication 103. Oxford: Pergamon Press (2007). The 2007 Recommendations of International Commission on Radiological Protection.
12. Ainsbury EA, Bouffler SD, Dorr W, Graw J, Muirhead CR, Edwards AA, Cooper J. "Radiation cataractogenesis: a review of recent studies". *Radiat. Res.* **172**, 1–9 (2009).
13. Wakeford R. "Radiation in the workplace-a review of studies of the risks of occupational exposure to ionising radiation." *J Radiol Prot.* **29**, 61-79 (2009).
14. Kleiman N. Euratom, "Radiation Cataract New insights in radiation risk and basic safety standards." *Radiation protection* **145**, 81–95 (2007).
15. Shore R.E. and B.V. Worgul. Overview of the epidemiology of radiation cataracts, p 183-189 in: *Ocular Radiation risk Assessment in Populations Exposed to Environmental Radiation Contamination* (A.K. Junk, Y. Kundiev, P. Vitte et al., Eds.) Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, 1998.
16. ICRP statement (2011).
17. SSK German Radiation Protection. 2009; Document N° 234.
18. Behrens R, Dietze G.. "Monitoring the eye lens: which dose quantity is adequate?" *Phys Med Biol.* **55**:4047-62 (2010).