

Evaluación de la **RADIOSENSIBILIDAD** del *personal sanitario*

EN PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO O DIAGNOSTICO MÉDICO CON RADIACIONES

La identificación de la radiosensibilidad individual en trabajadores expuestos a radiaciones ionizantes es un objetivo de gran relevancia para la prevención y protección contra los efectos adversos de la radiación desde el punto de vista de la salud y la seguridad ocupacional. Este estudio pretende ensayar y validar un nuevo biomarcador citogenético llamado test G2, que permita evaluar la radiosensibilidad individual del personal sanitario en procedimientos de tratamiento o diagnóstico médico con radiaciones ionizantes. Además, se pretende evaluar el estado antioxidante-oxidante, mediante diversos biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante. Ambos tipos de biomarcadores serán una herramienta más dentro de las medidas preventivas ya instauradas frente al riesgo de exposición a radiaciones ionizantes.





Por **ALEGRÍA MONTORO**. Doctora en Ciencias Biológicas. Titulada Superior Bióloga. Responsable Laboratorio de Dosimetría Biológica del Servicio de Protección Radiológica (SPR). Grupo de Investigación Biomédica en Imagen GIBI230. IISLAFE. (montoro_ale@gva.es). **NATIVIDAD SEBASTIÀ**. Doctora en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Investigadora del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IISLAFE). **REGINA RODRIGO**. Doctora en Ciencias Biológicas, Grupo Enfermedades Neurosensoriales, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia. **DAVID HERVÁS**. Licenciado en Biología. Responsable Bioestadística del IISLAFE. **ÓSCAR ALONSO NACHER**. Médico. Responsable Sección Vigilancia Médica del SPR. **LAURA MARTÍ, ESTHER JAMBRINA, ANA SARRIAS**. Estudiantes en prácticas de la Facultad de Ciencias Biológicas. **JOSÉ PÉREZ-CALATAYUD**. Doctor en Ciencias Físicas. Jefe de Sección de Radiofísica del Servicio de Radioterapia. **TERESA GARCÍA**. Licenciada en Ciencias Físicas. Facultativa Especialista en Radiofísica. Sección de Radiofísica del Servicio de Radioterapia. **PILAR GRAS**. Doctora en Ciencias Físicas. Facultativa Especialista en Radiofísica del SPR. **JUAN IGNACIO VILLAESCUSA**. Doctor en Ciencias Físicas. Facultativo Especialista en Radiofísica y Jefe del Servicio de SPR. Grupo de Investigación Biomédica en Imagen GIBI230. IISLAFE. **JOSÉ MIGUEL SORIANO**. Doctor en Farmacia. Profesor Titular del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universitat de València. **ZACARÍAS LEÓN**. Doctor en Ciencias Químicas. Responsable Unidad Analítica del IISLAFE.

La radiosensibilidad es la respuesta de un sistema biológico frente a la radiación. En los seres humanos se ha observado un rango de variación en la frecuencia y severidad de los efectos que presentan tras una exposición a radiaciones, la cual se debe a diferencias individuales en su radiosensibilidad. Estas diferencias individuales pueden ser debidas a una componente genética, al estado de la microvasculatura (diabetes, senescencia, aterosclerosis) o a las alteraciones de la respuesta inmune (lupus eritematoso, esclerodermia, dermatomiositis).

Existe un sector laboral, los trabajadores expuestos a radiaciones ionizantes, en el cual la identificación de la radiosensibilidad individual es un objetivo

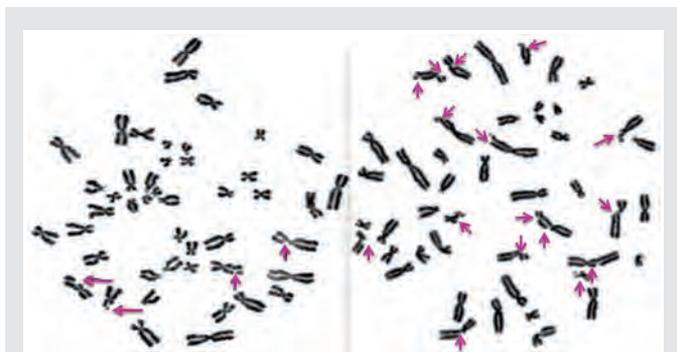


Figura 1. Roturas cromosómicas después de 1 Gy de rayos γ visualizadas en una metafase de linfocitos de sangre periférica humana, a) G2 convencional, b) G2 aplicando la eliminación del punto de control mediante la cafeína (las flechas señalan las roturas o ctb).

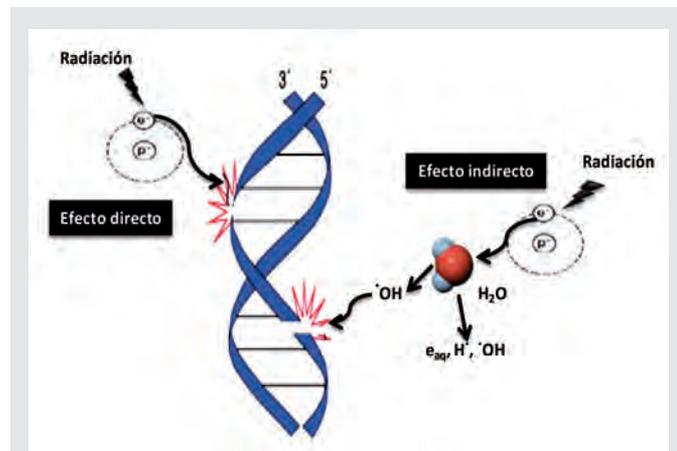


Figura 2. Representación del efecto directo e indirecto de la radiación ionizante sobre el ADN.

de gran relevancia para la prevención y protección contra los efectos adversos de la radiación desde el punto de vista de la salud y la seguridad ocupacional, ya que la radiosensibilidad celular está relacionada con la predisposición al cáncer. Uno de los campos donde la evaluación de la radiosensibilidad individual resultaría de gran valor es, por ejemplo, en la radiología intervencionista.

En los últimos años se han obtenido evidencias que apoyan la hipótesis de que determinadas variantes génicas juegan un papel importante en la respuesta a la radiación, siendo un factor determinante y predictivo de la radiosensibilidad individual y del desarrollo de efectos adversos tras la exposición a radiaciones ionizantes⁽¹⁾. Estas variantes pueden analizarse mediante estudios moleculares de variantes alélicas en genes implicados en la reparación del ADN o bien mediante análisis citogenéticos que evalúan el daño cromosómico en determinadas fases del ciclo celular. En el segundo caso, la evaluación del daño cromosómico (en forma de roturas de cromátida, fig. 1) en la fase G2 del ciclo celular (la fase más radiosensible del ciclo celular) como biomarcador de la exposición a radiaciones ionizantes resulta de especial

interés; dicha técnica es conocida como «ensayo en fase G2».

Su aplicación en la evaluación de la radiosensibilidad se basa en que la variación en el número de roturas de cromátida ha sido correlacionada por varios estudios con la variación de la radiosensibilidad y la predisposición al cáncer^(2,3) y el método inicial, mejorado por Pantelias y Terzoudi⁽⁴⁾, ha sido validado en pacientes con radiosensibilidad confirmada, como son los casos del síndrome de Ataxia Telangiectasia^(5,6). Por consiguiente, se ha reconocido en el ámbito científico que el parámetro de radiosensibilidad obtenido del ensayo en fase G2 puede ser usado para evaluar la radiosensibilidad individual y la predisposición al cáncer, ya que éste refleja diferencias intraindividuales en mutaciones específicas o polimorfismos en genes que controlan la capacidad de reparación del daño en el ADN y la activación del punto de control en la fase G2 después de la irradiación.

Por otro lado, en los trabajadores expuestos a radiaciones ionizantes existen determinados parámetros que pueden verse alterados, como es el estado antioxidante-oxidante debido a un aumento del estrés oxidativo. La radiación ionizante interacciona con los componentes y estructuras biológicas de dos formas principalmente: por medio de una interacción directa con ellos (efecto directo) o mediante la generación de radicales libres a partir de la radiólisis de las moléculas de agua, que, a su vez, atacarán al resto de estructuras biológicas (efecto indirecto) (fig. 2). Es el efecto indirecto el responsable de aumentar el estrés oxidativo por medio de un aumento de los niveles de radicales libres y de especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS).

El término ROS es un concepto utilizado por el colectivo científico para definir un grupo de sustancias oxidantes, sobre todo radicales libres o determinadas especies moleculares capaces de generar

Existe un sector laboral, los trabajadores expuestos a radiaciones ionizantes, en el cual la identificación de la radiosensibilidad individual es un objetivo de gran relevancia para la prevención y protección



radicales libres. Principalmente, la generación de ROS intracelulares comprende al radical superóxido O_2^- y a los radicales del óxido nítrico NO (fig. 3).

Todas las formas de vida mantienen un estado estable de ROS determinado por el balance entre su producción y su eliminación a través de la maquinaria antioxidante endógena constituida por moléculas y enzimas antioxidantes (superóxidodismutasa –SOD–, glutatión peroxidasa –GSH-Px– y catalasa –CAT–, entre otras), o de antioxidantes de fuentes externas como los alimentos o complementos nutricionales (ácido ascórbico –vitamina C–, α -tocopherol –vitamina E–, glutatión reducido –GSH–, carotenoides, flavonoides, polifenoles, entre otros.). La SOD convierte el anión superóxido en H_2O_2 , el cual es un sustrato para la CAT y GSH-Px. La CAT metaboliza el H_2O_2 en agua y oxígeno y el GSH-Px reduce el H_2O_2 y los hidroperóxidos. El glutatión (GSH) es uno de los tioles no proteicos de bajo peso molecular endógenos más abundantes en la célula. Es el principal antioxidante soluble intracelular que modula los niveles fisiológicos de ROS y participa en la respuesta celular al estrés oxidativo. Es esencial para la protección del cerebro frente al

estrés oxidativo, actuando como sequestrador de ROS e inhibidor de la peroxidación lipídica. También participa en la detoxificación del peróxido de hidrógeno a través de las glutatión peroxidadas. El cociente entre el glutatión reducido GSH y el oxidado (GSSG) es un indicador del estado redox de la célula e

incluso de muerte celular, siendo el GSH reducido el 98 por ciento de todo el GSH celular en condiciones normales. El desequilibrio de GSH se observa en muchas enfermedades, incluyendo cáncer, arterioesclerosis, enfermedades neurodegenerativas o la edad. El GSH también participa en la detoxificación de xenobióticos electrofílicos, modulación del estado redox, almacenamiento y transporte de cisteína, regulación de la proliferación celular, síntesis de deoxiribonucleótidos, regulación de respuesta inmunitaria y del metabolismo de leucotrienos y prostaglandinas ⁽⁷⁾.

Sin embargo, un aumento de los niveles de estrés oxidativo debido a la exposición a la radiación ionizante resulta perjudicial para el organismo, ya que los radicales libres son considerados como eventos iniciadores y perpetuadores de la acción de la radiación ionizante en los organismos vivos, siendo causa de mutaciones, apoptosis celular e incluso creando una situación de posible ines-

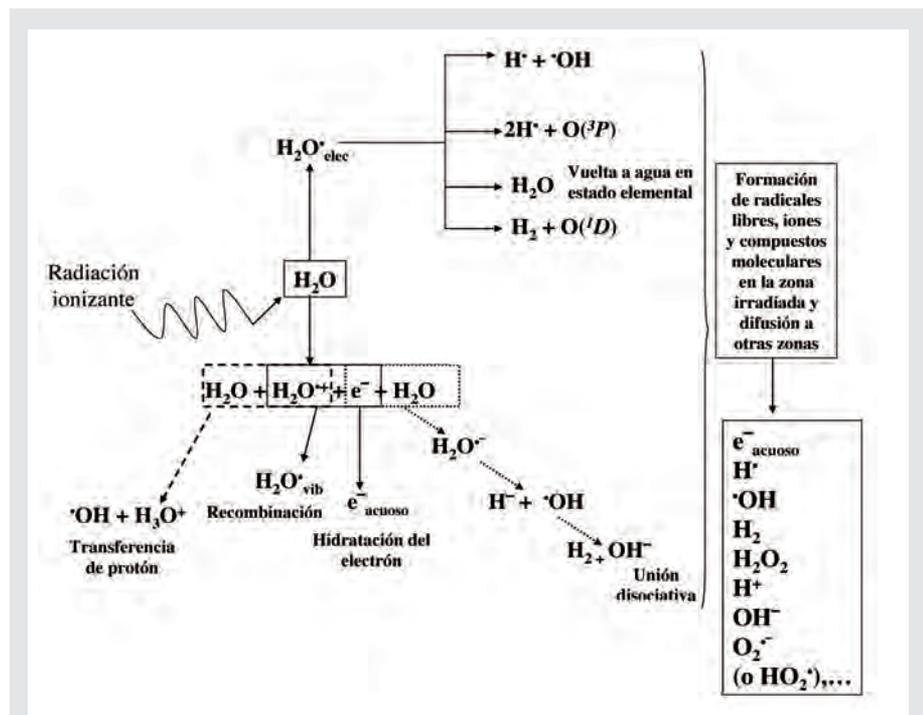


Figura 3. Reacciones más frecuentes de radiólisis y sus productos más importantes.

tabilidad genética. De hecho, existe un consenso general de que los procesos oxidativos desempeñan un papel importante en la patogénesis de varias enfermedades, como los procesos neurodegenerativos, el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y daño hepático.

Además, se ha visto que los radicales libres junto con la producción de citoquinas y señalización intercelular (producida en ocasiones por efecto de la radiación ionizante) son indicadores de respuestas inflamatorias, que también pueden aumentar el riesgo de desarrollar determinadas patologías.

Cabe mencionar que el personal sanitario está expuesto a dosis de radiación bajas y de forma «continua». Resulta interesante hacer hincapié en este hecho, ya que este tipo de exposición puede conllevar a dos posibles escenarios: por un lado, la afectación de las biomoléculas mencionadas anteriormente (lípidos, polisacáridos o proteínas o ADN) y, por otro, la llamada «respuesta adaptativa», que resultaría en una susceptibilidad menor de las células a la radiación ionizante al mantener activos los sistemas desintoxicantes como el de enzimas antioxidantes, los mecanismos de reparación del ADN o la apoptosis. Estudios básicos sobre los mecanismos de la respuesta biológica a la radiación en dosis bajas se consideran una prioridad de investigación con el fin de comprender mejor los riesgos laborales asociados al trabajo.

Objetivos

El primer objetivo de este proyecto es ensayar y validar un nuevo biomarcador citogenético, el test G2, que permita evaluar la radiosensibilidad individual. Este biomarcador se podrá utilizar como medida preventiva para la evaluación de la radiosensibilidad indivi-

dual en el personal sanitario que ejecuta procedimientos de diagnóstico y/o tratamiento médico con radiaciones ionizantes. El segundo objetivo consiste en la evaluación del estado antioxidante-oxidante mediante diversos biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante de los trabajadores expuestos a radiaciones ionizantes.

Materiales y metodología

Selección de personal

La selección del personal a estudiar ha sido realizada de acuerdo a varios parámetros, dependiendo de los puestos de trabajo o servicios catalogados como «profesionalmente expuestos a radiaciones ionizantes» según el Real Decreto 783/2001, de 6 de julio, del Reglamento de Protección Sanitaria⁽⁸⁾. También se ha seleccionado un número de personal no expuesto para formar el grupo control.

Entre los trabajadores clasificados como categoría A, la distribución entre los servicios seleccionados para la realización del ensayo de radiosensibilidad individual queda de la siguiente forma: grupo 100: Servicio de Hemodinámica e Intervencionismo Vascular; grupo 200: Servicio de Oncología Radioterápica; grupo 300: Servicio de Medicina Nuclear; grupo 400: Otros (quirófano, dosis elevadas, patologías inespecíficas...); y grupo 500: Grupo control.

Los grupos incluían ambos géneros y con un rango de edades comprendido dentro de la edad laboral. El personal seleccionado leyó y comprendió la hoja de información al paciente y, estando de acuerdo en formar parte del estudio, firmó el consentimiento informado. Ambos documentos tienen el dictamen favorable del Comité Ético del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (CEIC).

Estudio de radiosensibilidad

Equipos de irradiación

Irradiador Biobeam 2000/200/8000.
Equipo autoblandado diseñado para la irradiación de hemoderivados, muestras de tejido, pequeños animales, investigación y desarrollo en Biología. Contiene una fuente consistente en un isótopo ^{137}Cs con una actividad de $2.200\ \mu\text{Ci} \pm 20$ por ciento y una tasa de dosis en contacto menor que $3\ \text{Sv/h}$. Realiza un cálculo automático del tiempo de irradiación de acuerdo con la dosis marcada (fig. 4).

Acelerador lineal modelo Clinac iX (Varian Medical System, Palo Alto, CA, USA). El equipo emite fotones de $15\ \text{MV}$ de energía nominal generados en un acelerador lineal. El campo de irradiación utilizado fue de $40 \times 40\ \text{cm}$ (en isocentro a $1.000\ \text{mm}$ del foco). Los frascos que contenían las muestras de sangre se colocaron a $1.035\ \text{mm}$ de distancia al foco,



Figura 4. Irradiador Biobeam 2000/200/8000.



Figura 5. Acelerador lineal modelo Clinac IX

disponiéndose de un *build up* de 35 mm de espesor constituido por bloques de agua sólida para irradiar en condiciones de equilibrio electrónico. La tasa de dosis fue de 200 cGy/min durante un tiempo de 0.5 minutos para conseguir irradiar a una dosis de 1 Gy (fig. 5).

Obtención de la muestra, cultivo e irradiación

De cada individuo se extrajeron unos 5 ml de sangre mediante venipunción antecubital, recogiendo en tubos *vacutainer* previamente heparinizados. La metodología se realizó de acuerdo a Pantelias y Terzoudi (4). Para el cultivo de linfocitos de sangre periférica se adicionó 1 mL de sangre total a 9 mL de medio PB-MaxTMKaryotyping y se incubó a 37 °C durante 72 horas.

A las 72 horas, el cultivo se interrumpió para su irradiación. Las irradiaciones se realizaron en dos equipos diferentes. In-

mediatamente después de las mismas los cultivos se dividieron en dos partes iguales para tratar sólo a una de ellas con cafeína (4 mM). Todas las muestras se incubaron durante 15-20 minutos a 37° C para permitir alcanzar la mitosis en los linfocitos. Transcurrido este tiempo, se añadió una sustancia antimitótica para detener el cultivo celular y a los 90 minutos aproximadamente de la irradiación se procedió al sacrificio del cultivo. Para ello, se centrifugaron las muestras, se realizó un choque osmótico con KCl 75 mM, se fijaron las metafases con el fijador de Carnoy (metanol/ácido acético glacial (3:1 v/v)) y se prepararon las extensiones para su tinción (fig. 6a).

Análisis citogenético

Se realizó la búsqueda de aberraciones cromosómicas, concretamente de roturas cromatídicas e isocromatídicas (*chromatid type breaks*, *ctb*). Se analizaron roturas y *gaps*, este último únicamente cuando fuera más largo que el ancho de la cromátida. El análisis se llevo a cabo mediante un microscopio automático y un sistema de análisis de ima-

El parámetro de radiosensibilidad obtenido del ensayo en fase G2 puede ser usado para evaluar la radiosensibilidad individual y la predisposición al cáncer

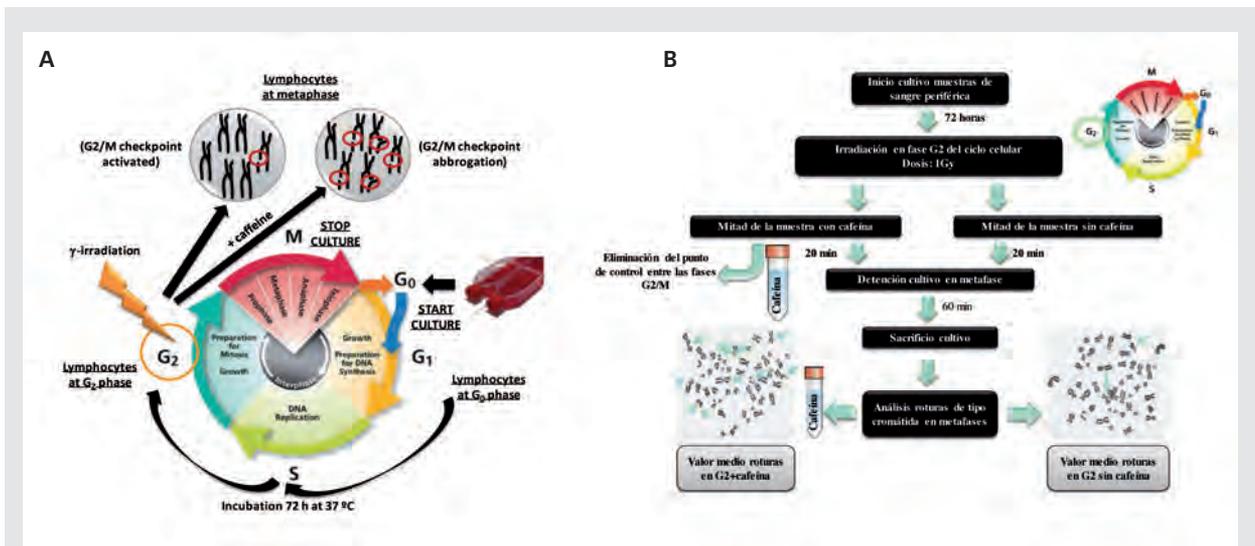


Figura 6. a) Representación esquemática de las características esenciales del ensayo G2; b) Esquema del ensayo G2 de radiosensibilidad individual.

gen con el *software* Ikaros. Este tipo de aberraciones se analizó en 50 metafases tratadas con cafeína y en 50 metafases no tratadas, para cada individuo. A partir del valor medio de roturas de cromatídicas e isocromatídicas se calculó el parámetro de radiosensibilidad individual (PRI), definido como: $PRI = (\text{valor medio roturas en muestras G2} / \text{valor medio roturas en muestras G2 + caf}) \times 100$ por ciento. La Figura 6b muestra un esquema del ensayo G2.

Análisis estadístico

Se comprobó la distribución de los valores de PRI de los sujetos estudiados mediante un método de estimación por Kernel ⁽⁹⁾.

Evaluación del estado antioxidante-oxidante

Obtención de las muestras

De las muestras de sangre periférica obtenidas de los sujetos se separó el plasma por centrifugación a 1.200 rpm y se recogió en tubos Eppendorf de 1.5 mL para su congelación a -80°C y posterior determinación de los distintos biomarcadores de estado antioxidante-oxidante en el plasma fresco.

Determinación del estado antioxidante

–Determinación de la capacidad antioxidante total (TEAC) en plasma mediante un *kit* comercial de Cayman Chemical.

–Determinación de la actividad de la SOD extracelular (ecSOD) en las muestras de plasma mediante un *kit* comercial de Cayman Chemicals.

–Determinación de GSH y GSSG (GSH



oxidado) en plasma mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (UPLC-MS/MS) Waters Xevo TQ-S.

Determinación del estado oxidante

–Determinación de la formación de TBARS (sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico) en plasma como indicador de peroxidación lipídica mediante un *kit* comercial de Cayman Chemicals.

–Determinación de nitritos y nitratos (NOX) en plasma mediante la reacción de Griess, que determina nitritos, metabolito estable del NO.

Estudio estadístico

Cada uno de los marcadores se analizó mediante un modelo lineal de regresión en el que se incluyó la edad, el género y el tabaco como posibles facto-

res que podrían afectar a dicho marcador además del grupo. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los análisis se llevaron a cabo mediante el programa estadístico R versión 3.0.2.

Estudio clínico/Encuesta clínica

A todos los sujetos se les realizó una encuesta clínica en la que se detallaban determinados parámetros que pueden influir en los resultados de la evaluación del estado antioxidante-oxidante como niveles de colesterol ⁽¹⁰⁻¹²⁾, hipertensión ⁽¹³⁾, hábito tabáquico ⁽¹⁴⁾, consumo de suplementos alimenticios ⁽¹⁵⁾, etc.

Estudio nutricional

Debido a la importancia de la dieta como fuente exógena de moléculas antioxidantes, se realizó una entrevista dietética basada en un método prospectivo denominado diario dietético para anotar todos los alimentos y bebidas diarias, y estimar a partir de estos valores el poder antioxidante del consumo diariamente. El entrevistador utiliza normal-

En estos trabajadores existen determinados parámetros que se ven alterados, como es el estado antioxidante-oxidante. Un aumento de los niveles de estrés oxidativo resulta perjudicial para el organismo.

mente fotografías o medidas caseras con el fin de ayudar al entrevistado a cuantificar las cantidades físicas de alimentos y/o ingredientes de los platos y bebidas.

La capacidad antioxidante total (CAT) de lo ingerido se calcula de acuerdo a esos alimentos y a los valores de capacidad antioxidante lipohidrofílica desarrollados por Wu *et al.* (2005)⁽¹⁶⁾ disponibles según la técnica ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) y expresados en micromoles equivalentes de trolox por gramo.

Dosimetría física

Como trabajadores expuestos a radiaciones ionizantes se determinó la dosis absorbida durante los 12 meses anteriores a la toma de muestra de sangre periférica. Para ello se consultó el historial dosimétrico de cada sujeto que recoge el Centro Nacional de Dosimetría (CND) y Lainsa, ambos autorizados por el CSN, a partir de las lecturas mensuales de los distintos dosímetros (solapa, anillo o muñeca) que el personal expuesto a radiaciones ionizantes debe utilizar durante la exposición.

Resultados

Radiosensibilidad

Los estudios se iniciaron con un equipo de irradiación (Biobeam) diseñado para la irradiación de hemoderivados, muestras de tejido, pequeños animales, investigación y desarrollo en biología, que validamos para esta técnica concreta. Una vez comprobado que la dosis no era homogénea en las muestras, se decidió irradiar con un acelerador lineal modelo Clinac iX.

A partir del análisis de los dos valores obtenidos (media de roturas de cromátida, ctb) en muestra tratada con (-ctb G2 + caf-) y sin cafeína (-ctb G2-) para cada muestra de sangre periférica de cada sujeto perteneciente a los distintos

grupos, se calculó el Parámetro de Radiosensibilidad Individual (PRI) para cada individuo. Tras el análisis de la distribución del PRI entre el total de sujetos estudiados se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 7.

Los trabajadores del Hospital Universitario y Politécnico La Fe expuestos a las radiaciones ionizantes obtuvieron valores de PRI en un rango comprendido entre el 41,89 por ciento y el 52,55 por ciento. Por su parte, el grupo de sujetos control obtuvo valores de PRI comprendidos entre el 36,03 por ciento y el 68,05 por ciento.

La validación de la técnica, en relación a su reproducibilidad, se llevó a cabo repitiendo la irradiación y el análisis

a cinco individuos para finalmente comprobar que el dato de PRI era el mismo.

Evaluación del estado antioxidante-oxidante

En la Tabla 1 se muestran las características de los 60 sujetos en los que se determinó el estado antioxidante-oxidante en el plasma.

Los resultados de los marcadores del estado antioxidante-oxidante se muestran en la Figura 8. Debido al tamaño muestral reducido por grupo no fue posible comparar los grupos entre sí dos a dos. Sin embargo, el análisis de regresión lineal sugirió que existían diferencias significativas en la mayoría de los marcadores estudiados.

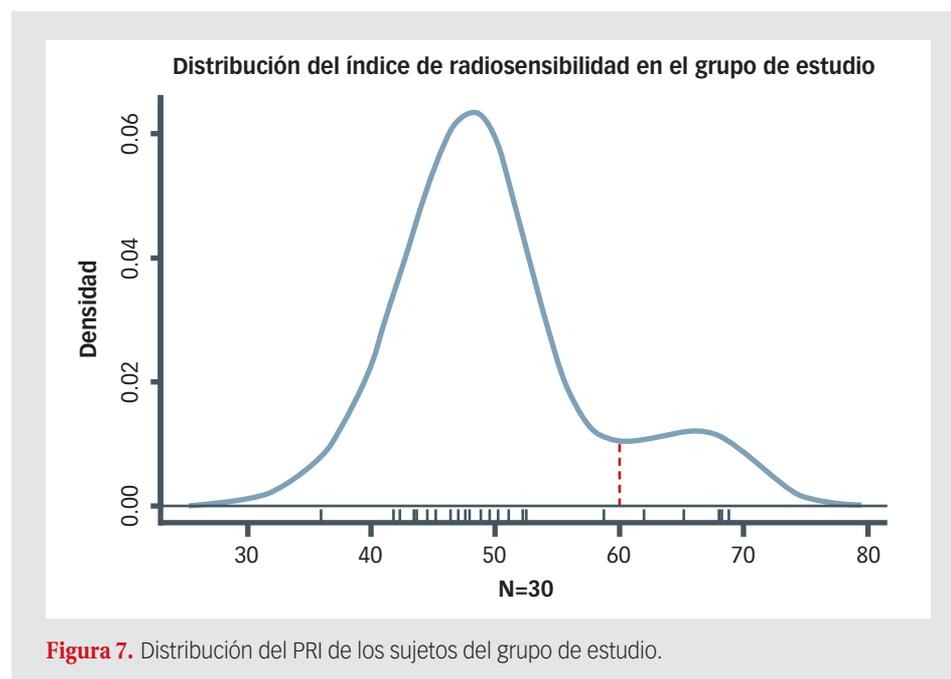


Figura 7. Distribución del PRI de los sujetos del grupo de estudio.

Tabla 1. Descripción del número, edad, género y hábito tabáquico de sujetos participantes en la evaluación del estado antioxidante-oxidante.

	Grupo 100	Grupo 200	Grupo 300	Grupo 400	Grupo 500
Nº participantes	14	14	7	11	14
Edad	49 ± 3	50 ± 3	45 ± 4	50 ± 4	38 ± 3
Género					
(Nº de mujeres)	11	10	6	7	9
Tabaco					
(Nº fumadores)	4	3	5	1	1

Según nuestros valores de PRI, 11 sujetos de un total de 30 (36%) presentan valores situados en este rango, por lo que deberían clasificarse como «radiosensibles»

Respecto a la capacidad antioxidante total o TEAC, se encontraron diferencias significativas entre los grupos (modelo de regresión lineal, $P < 0,01$). Los resultados sugirieron que los sujetos del grupo 300 tenían menos TEAC que el grupo 500 (control) (fig. 8a). La edad y el género no afectaron; sin embargo, el tabaco disminuyó significativamente en TEAC.

Respecto a la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), se encontraron diferencias significativas entre los grupos (modelo de regresión lineal, $P = 0,03$). Los resultados sugirieron que los sujetos del grupo 200 tenían una actividad SOD aumentada respecto al grupo control (500) (fig. 8b). No se observó un efecto significativo de la edad, el género o el tabaco en esta variable.

Respecto a la formación de TBARS, se encontraron diferencias significativas entre los grupos (modelo de regresión lineal, $P < 0,001$). Los resultados sugirieron que los sujetos de los grupos 300 y 400 presentaban niveles más elevados que el grupo 500 (control) (fig. 8c). La edad, el género y el tabaco no afectaron al contenido de TBARS.

Respecto a los niveles de nitritos y nitratos (NOX), no existieron diferencias significativas entre los grupos (fig 8d). La edad y el género no afectaron al contenido de NOX. Sin embargo, los individuos fumadores, independientemente del grupo, sí mostraron niveles de NOX significativamente más elevados para los distintos grupos de estudio.

Se determinó el cociente del GSH (glu-

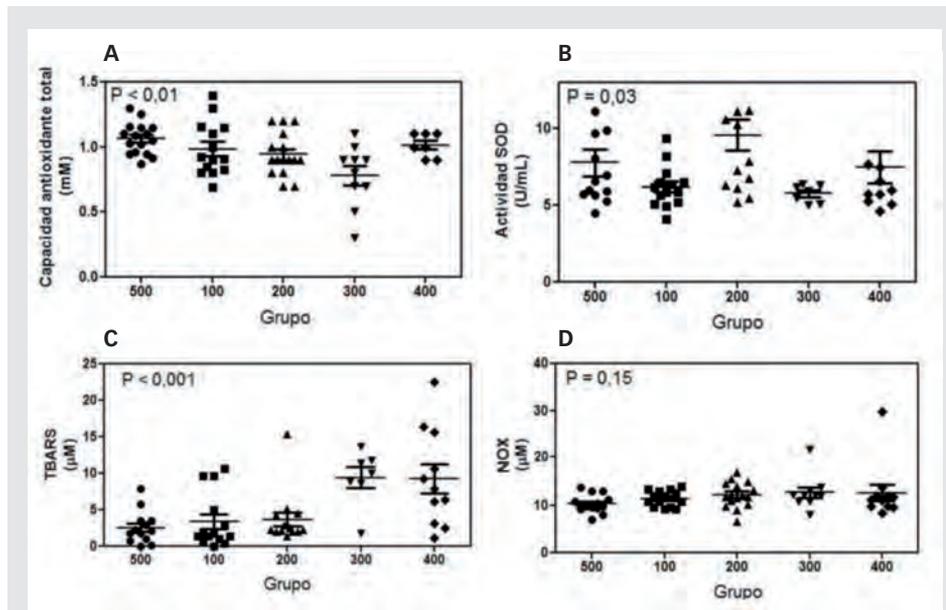


Figura 8. Valores de marcadores del estado antioxidante-oxidante para los distintos grupos de estudio. A: TEAC (capacidad antioxidante), B: SOD (superóxido dismutasa), C: TBARS (peroxidación lipídica) y D: NOX (óxido nítrico).

tación reducido) y GSSG (glutación oxidado) en 25 de las 60 muestras analizadas. Estos resultados preliminares sugirieron que el grupo 200 presentaba un mayor cociente GSH/GSSG, es decir, un contenido más elevado de glutación reducido que de glutación oxidado (GSSG), lo que indica un mayor poder reductor (fig. 9).

En conclusión, estos resultados sugieren que el grupo 300 (trabajadores de medicina nuclear) es el que presenta más estrés oxidativo (mayor TBARS) y menor defensa antioxidante (TEAC y actividad SOD) en comparación con el grupo 500 (control). Los resultados sugieren que el grupo 200 tiene una defensa antioxidante mayor con unos valores de actividad SOD y GSH/GSSG más elevados que el grupo 500.

Las variables edad y género no se han representado ya que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos en prácticamente ningún parámetro.

Cuestionario clínico

Dado que en el Servicio de Protección Radiológica posee un Servicio de Vigilancia Médica, se solicitó la información médica necesaria para intentar relacionarla con los resultados. La única variable contemplada que influyó en los análisis fue el hábito tabáquico, como se ha explicado en los resultados de la actividad antioxidante-oxidante. El resto de variables, como un determinado tipo de enfermedad, colesterol o hipertensión

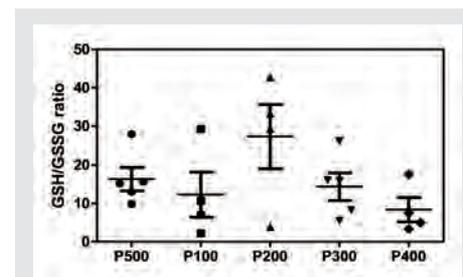


Figura 9. Cociente de GSH/GSSG (glutación reducido/glutación oxidado) obtenido en los distintos grupos de estudio.

elevados, o ingesta de suplementos vitamínicos, no se pudo relacionar con los resultados obtenidos debido a que el tamaño muestral fue reducido para poder establecer diferenciaciones entre enfermedades, niveles de colesterol, etc.

Estudio nutricional

El estudio demuestra que la capacidad antioxidante de la población estudiada es de un 75,4 por ciento del valor para la población española (10.577,9 CAT/día), probablemente, tal y como refleja la encuesta utilizada, porque la mayoría de trabajadores no realizan las cinco comidas al día ni la ingesta de cinco raciones de fruta/verdura al día recomendadas. Una causa posible de este hecho es el horario laboral seguido por los trabajadores el cual les impide en muchas ocasiones realizar estas cinco ingestas y seguir una alimentación basada en la dieta mediterránea.

Dosimetría física

A continuación se muestra la Tabla 2, que recoge los datos de dosis absorbida

(mSv) del grupo 100 en los últimos 12 meses anteriores a la extracción de las muestras de sangre (mostramos los datos de dosis del grupo 100 como ejemplo). Los datos de dosimetría física se han obtenido a partir de la lectura mensual de los dosímetros personales (solapa, muñeca y/o anillo).

Discusión

El presente estudio es pionero a nivel de medicina preventiva, ya que es el primero que analiza un biomarcador de radiosensibilidad individual en trabajadores expuestos a radiaciones ionizantes. Debido a su novedad, no existen en la bibliografía estudios parecidos; no obstante, sí existen los trabajos llevados a cabo por el grupo de Terzoudi ⁽¹⁾, en los

cuales se puso a punto el llamado test de radiosensibilidad en fase G2. En este trabajo se establecieron los rangos que clasificaban a los sujetos como «radioresistentes», «normales», «radiosensibles» y «muy radiosensibles», rangos determinados en su población de estudio. De acuerdo a este trabajo, los individuos «radiosensibles» son aquellos cuyo PRI se encuentra entre el rango de 50-70 por ciento. Según nuestros valores de PRI y de acuerdo con Pantelias y Terzoudi ⁽⁴⁾, 11 sujetos de un total de 30 (36 por ciento) presentan valores situados en este rango, por lo que deberían clasificarse como «radiosensibles». Entre ellos, ocho son controles y tres son trabajadores, no teniendo ninguna relación que la mayoría sean controles, ya que la característica de radiosensibilidad es considerada como genética o intrínseca al individuo.

Los resultados sugieren que el grupo de medicina nuclear es el más afectado por su exposición a radiaciones ya que tiene niveles elevados de peroxidación lipídica y menor defensa antioxidante

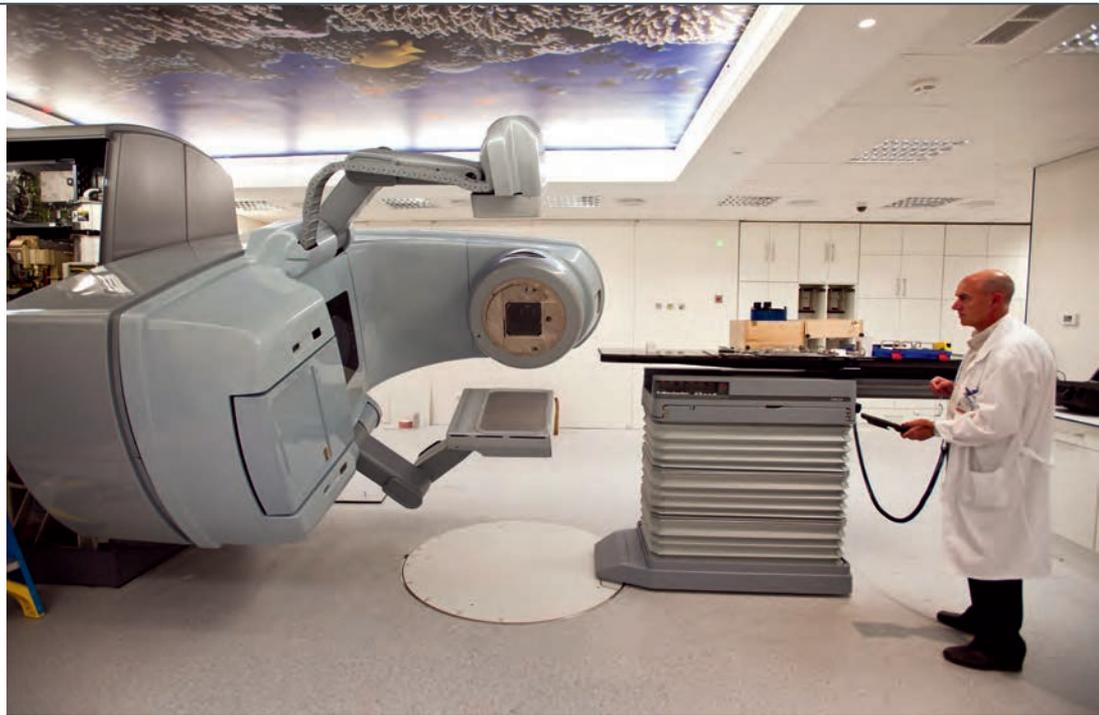
		Dosis absorbida (mSv)												
Dosímetro	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 11	Mes 12	Total	
101 Solapa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
102 Solapa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
103 Solapa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Muñeca	0,8	0,2	0,3	0,4	0	0,2	0,2	0,5	0,2	0,6	0,2	0,4	4	
104 Solapa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
105 Solapa	0,4	No lleva	0,7	0	No lleva	No lleva	No lleva	0	No lleva	No lleva	0,4	No lleva	1,5	
Muñeca	0,4	0	1,2	0	No lleva	No lleva	No lleva	0	No lleva	No lleva	0	0	1,6	
106 Solapa	0	0	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3	0	0	0,1	1,4	
Muñeca	3	2,1	2,7	2,9	2,8	2,5	3,5	2,2	4,9	2	0	3,5	32,1	
107 Solapa	0	0	nr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Muñeca	0,3	0,2	nr	2,3	0,3	0,2	0,2	0	0,4	0,2	0	0	4,1	
108 Solapa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
109 Solapa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
110 Solapa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Muñeca	0	0	0	0	0	0	0,2	0,2	0,1	0	0,4	0,7	1,6	
111 Solapa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Muñeca	0,7	0	0	0,9	1,1	0,9	0,4	0,4	1	1,4	0,2	0,8	7,8	
112 Solapa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
113 Solapa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
114 Solapa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabla 2. Dosis absorbida en los sujetos del grupo 100.

El tamaño muestral fue reducido para poder establecer de forma estadísticamente significativa rangos propios de radiosensibilidad a la población estudiada; por ello, los valores de PRI se han comparado con los obtenidos por Pantelias y Terzoudi ⁽¹⁾. Estudios futuros con mayor número de muestra permitirán establecer rangos de radiosensibilidad individual estadísticamente significativos para así mejorar las medidas preventivas de los trabajadores expuestos a radiaciones ionizantes.

Respecto al estado antioxidante-oxidante, los resultados sugieren que los valores en los trabajadores expuestos a dosis bajas de radiación ionizante difieren del grupo control. Aunque no es posible comparar cada grupo de trabajadores con el grupo control debido al tamaño muestral, se puede concluir que existen diferencias entre los distintos grupos. Los resultados sugieren que el grupo 300 es el más afectado ya que tiene niveles elevados de TBARS y menor defensa antioxidante (TEAC y actividad SOD).

La radiación ionizante genera la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en varios tipos de células, los cuales poseen una alta reactividad celular con componentes y macromoléculas como el ADN, los lípidos y las proteínas. En el individuo sano hay un equilibrio entre la formación de radicales libres y la capacidad antioxidante; sin embargo, este equilibrio se ve interrumpido por un proceso de enfermedad, por la exposición excesiva o crónica a radiación ionizante, etc., la cual conduce a un estrés oxidativo. Existen en la bibliografía estudios similares al nuestro respecto a la capacidad antioxidante. El trabajo de Oli-



sekodiaka *et al.*⁽¹⁷⁾ realizado en un grupo de trabajadores expuestos a radiación ionizante mostró que la capacidad antioxidante total (TEAC) de los trabajadores no era significativamente menor que la del grupo control. Sin embargo, en el estudio de Hagelstrom *et al.*⁽¹⁸⁾ sí se detectó una capacidad antioxidante significativamente reducida en los trabajadores expuestos, quizá por la falta de una aplicación estricta de normas de protección sanitaria frente a las radiaciones ionizantes dada la fecha del estudio.

Nuestros datos respecto a la medida de TBARS indican un aumento de la peroxidación lipídica en el grupo 300, pertenecientes al servicio de medicina nuclear. Como se ha mencionado, un aumento de radicales libres en el medio celular inducido por la exposición a la radiación ionizante podría ser el responsable del aumento de la oxidación de los lípidos de membrana. Los trabajadores de medicina nuclear en su práctica habitual trabajan con emisores, es decir, energías que tienen una LET (Energía Lineal de Trans-

ferencia) superior a los fotones. En estos trabajadores hemos observado que presentan más estrés oxidativo que podría atribuirse a una relación entre mayor LET y mayor estrés oxidativo. Por el contrario, los datos sugieren que el grupo 200 podría haber desarrollado una «respuesta adaptativa» al estrés oxidativo aumentando la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y, probablemente, el cociente entre el glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG).

Estudios recientes sugieren que la exposición profesional crónica está asociada a un aumento en el riesgo de cáncer no despreciable para el personal sanitario más expuesto. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que dosis bajas de radiación inducidas por rayos X, por ejemplo, pueden hacer a los linfocitos humanos y a otras células menos susceptibles al daño genético. Este fenómeno es un ejemplo de «radiación respuesta de adaptación», que ha sido a menudo evocado como posible mecanismo para estimular ciertas funciones de protección. Esta respuesta adaptativa está apoyada por un estudio sobre la respuesta celular adaptativa en cardiólogos intervencionistas expuestos a dosis bajas de radiación de forma crónica en los cuales se observó un aumento

Los resultados sugieren que el grupo de intervencionistas tiene una defensa antioxidante mayor con unos valores de actividad SOD y GSH/GSSG más elevados que el grupo control

en los niveles de GSH⁽¹⁹⁾. En relación a la dosimetría física, hay que señalar que en el grupo de intervencionistas posiblemente no estén llevando siempre sus dosímetros o que en muchos casos los dosímetros no se encuentran en el campo de irradiación, lo que implica una exposición parcial del cuerpo. De hecho, en algunos casos los resultados citogenéticos muestran una exposición no uniforme⁽²⁰⁾. Así que, como recomienda la *International Commission for Radiation Protection* (ICRP), en intervencionismo, la valoración de la dosimetría física se debe hacer con doble dosimetría física.

Respecto al cuestionario clínico y encuesta dietética, al observar que la dieta, y su reflejo en algunos parámetros bioquímicos, no corresponden a las pautas recomendadas para seguir una dieta me-

diterránea, se ha planteado la posibilidad de confeccionar una guía saludable para dichos trabajadores que les ayude a seguir dichas pautas y a nivel individual tratar de correlacionarlo con sus valores de estado antioxidante-oxidante.

Conclusiones

Gracias a este estudio financiado por FUNDACIÓN MAPFRE en su convocatoria de Ayudas a la Investigación 2012 ha podido ponerse a punto el test de radiosensibilidad individual en fase G2. Debido al tiempo de estudio, el tamaño muestral se ha considerado como reducido para obtener resultados estadísticamente significativos en algunos parámetros; sin embargo, ha servido para obtener resultados

preliminares acerca de las características de determinados biomarcadores de estado antioxidante/oxidante, hábitos dietéticos, dosis de radiación absorbida y grado de radiosensibilidad. Investigaciones futuras ampliarán los resultados aquí obtenidos para conseguir una información más significativa y poder actuar en consecuencia para mejorar las acciones preventivas en trabajadores, y probablemente también en pacientes, expuestos a radiaciones ionizantes. ♦

Agradecimientos

Este trabajo es *in memoriam* del Dr. Miguel Almonacid Bujeda, compañero muy querido, que durante años realizó la vigilancia médica de los trabajadores del hospital expuestos a radiaciones, de los que se preocupaba y ocupaba tanto que motivó al equipo en el estudio de la radiosensibilidad individual.

Referencias

- [1] Terzoudi, GI; Hatzl, VI; Barszczewska, K; Manola, KN; Stavropoulou, C; Angelakis, P; Pantelias, GE. G2-checkpoint abrogation in irradiated lymphocytes: A new cytogenetic approach to assess individual radiosensitivity and predisposition to cancer. *Int J Oncol*. 2009, (5), 1223-30.
- [2] Scott, D; Spreadborough, AR; Jones, LA; Roberts, SA; Moore, CJ. Chromosomal radiosensitivity in G2-phase lymphocytes as an indicator of cancer predisposition. *Radiat Res*. 1996, (145), 3-16.
- [3] Scott, D; Barber, JB; Spreadborough, AR; Burrill, W; Roberts, SA. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int J Radiat Biol*. 1999, (75), 1-10.
- [4] Pantelias, GE; Terzoudi, G. A standardized G2-assay for the prediction of individual radiosensitivity. *Radiotherapy and Oncology*. 2011 (101), 28-34
- [5] Terzoudi, GI; Manola, KN; Pantelias, GE; Iliakis, G. Checkpoint abrogation in G2 compromises repair of chromosomal breaks in ataxia telangiectasia cells. *Cancer Res*. 2005, (65), 11292-11296.
- [6] Terzoudi, GI; Pantelias, GE. Cytogenetic methods for individualisation and risk individualisation after exposure to ionising radiation. *Radiat Prot Dosimetry*. 2006, (122), 513-520.
- [7] Rodrigo, R; Libuy, M; Felú, F; Hasson, D. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers*. 2013, (6), 773-90.
- [8] Real Decreto 783/2001, de 6 de julio, por el que se aprueba el Reglamento sobre protección sanitaria contra radiaciones ionizantes. BOE nº 178 26-07-2.
- [9] Scott, DN. *Multivariate Density Estimation, Theory, Practice and Visualization*. NW Wiley, 1992.
- [10] Davi, G; *et al*. In vivo formation of 8-Epi-prostaglandin F2 alpha is increased in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997, (17) 3230-5.
- [11] Martinet, W; Knaapen, MW; De Meyer, GR; Herman, AG; Kockx, MM. Oxidative DNA damage and repair in experimental atherosclerosis are reversed by dietary lipid lowering. *Circ Res*. 2001 (88), 733-9.
- [12] Deepa, PR; Varalakshmi, P. Atheroprotective effect of exogenous heparin-derivative treatment on the aortic disturbances and lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic diet fed rats. *Clin Chim Acta*. 2005 (355) 119-130.
- [13] Briones, AM; Touyz, RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens Rep*. 2010, (2) 135-42.
- [14] Van der Toorn, M; Rezayat, D; Kauffman, HF; Bakker, SJL; Gans, ROB; Koe, GH. Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009, (14), L109-L114.
- [15] Giardi, MT; Touloupakis, E; Bertolotto, D; Mascetti, G. Preventive or Potential Therapeutic Value of Nutraceuticals against Ionizing Radiation-Induced Oxidative Stress in Exposed Subjects and Frequent Flyers. *Int. J. Mol. Sci*. 2013, (14), 17168-17192.
- [16] Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agric Food Chem*. 2004, (12), 4026-37.
- [17] Olisekodiaka, MJ; Bello, TO; Onuegbu, AJ; Olowookere, CJ; Lebi, OM; Omotayo, LO; Igbeneghu, I; Olugbenga-Bello, AI. Evaluation of the serum total antioxidant status level in health workers exposed to low radiation doses in a large nigerian hospital. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*. 2009, (2), 152-156.
- [18] Hagelström AH, Gorla NB, Larrija IB. Chromosomal damage in workers occupationally exposed to chronic low level ionizing radiation. *Toxicol Lett*. 1995 Mar;76(2):113-7.
- [19] Russo, GL; Tedesco, I; Russo M, Cioppa, A; Andreassi, MG; Picano, E. Cellular adaptive response to chronic radiation exposure in interventional cardiologists. *Eur Heart J*. 2012, (3), 408-14.
- [20] Montoro, A; Rodríguez, P; Almonacid, M; Villaescusa, JI; Verdú, G; Caballín, MR; Barrios, L; Barquinerio, JF. Biological dosimetry in a group of radiologists by the analysis of dicentric and translocations. *Radiat Res*. 2005, (164), 612-7.