

Influencia de la dosis y tasa de dosis de radiación beta y gamma en el proceso de opacidad del cristalino “in vitro”

Michelin, S.; Rossini, A. y Dubner, D.

Influencia de la dosis y tasa de dosis de radiación beta y gamma en el proceso de opacidad del cristalino “in vitro”

Michelin, S., Rossini, A. y Dubner, D.

Autoridad Regulatoria Nuclear

RESUMEN

Las cataratas en su máxima expresión, son la causa más frecuente de ceguera a nivel mundial. Existen diversos factores que pueden originar opacidad del cristalino, ya sea propios del individuo o externos. El cristalino es uno de los órganos más sensibles a las radiaciones ionizantes. En el presente trabajo se determinó la radiosensibilidad “*in vitro*” a baja tasa de dosis de radiación beta de células germinales del cristalino, observándose una disminución significativa de la sobrevivencia para dosis mayores a 1 Gy y alteraciones morfológicas compatibles con la senescencia celular. Los estudios morfológicos por microscopía electrónica de barrido de las fibras en cristalininos permitieron obtener imágenes de alta resolución de la configuración de las fibras, lo que indicaría la importancia de la técnica como herramienta para el estudio de potenciales lesiones en cristalino producto de la exposición a radiaciones ionizantes.

1. INTRODUCCIÓN

Las cataratas en su máxima expresión, son la causa más frecuente de ceguera a nivel mundial. Se estima que en el mundo, 25 millones de personas padecen esta patología. (Roodhooft 2002).

La frecuencia de aparición de las cataratas aumenta con la edad. Además de los factores genéticos (cataratas congénitas, síndromes de Marfan, de Down y Cockayne, trisomías del par 13 y 15), existen otros factores que pueden incrementar su frecuencia, por ejemplo: la exposición a la luz solar, el consumo de alcohol y nicotina, las inflamaciones oculares, la diabetes, el uso sistémico de corticoides y estrógenos, las radiaciones ultravioletas, microondas, las radiaciones ionizantes, etc. (Abraham 2006, West 2007, McCarty 2002, Asbell 2005, Henderson 2010, Wolf 2008). Actualmente se considera que la etiología de las cataratas es multifactorial.

El cristalino es uno de los órganos más sensibles a las radiaciones ionizantes. Se ha observado un aumento de la incidencia de cataratas en los sobrevivientes de Hiroshima, Nagasaki y Chernobyl, en pacientes adultos y niños, por prácticas médicas, en médicos intervencionistas, en pilotos de líneas comerciales y astronautas.

Existen tres formas predominantes de cataratas, dependiendo de la ubicación anatómica de la opacidad dentro del cristalino. Puede ser cortical, nuclear o subcapsular posterior (SCP).

E-mail del Autor: smichelin@arn.gob.ar

Las cataratas causadas por las radiaciones ionizantes, generalmente, pero no exclusivamente, difieren de las causadas por la edad. Ellas están asociadas a la región subcapsular posterior y algunas veces son corticales (Ainsbury 2009).

El proceso de opacidad por radiación, se genera en la superficie anterior del cristalino desde donde las células epiteliales germinativas comienzan a migrar hacia la parte subcapsular desarrollando una anormal proliferación y diferenciación. Concomitantemente, se generan alteraciones en el plegamiento y formación de las proteínas, lo cual implica una posible alteración en el ADN como evento primario responsable de la formación de cataratas (Worgul 1989).

El período de latencia y la severidad de los efectos dependen de la edad y son dependientes de la dosis, la tasa de dosis y del fraccionamiento, sin tener en cuenta otros parámetros propios del individuo. 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 (Wilde 1997). Se observó además, que el periodo de latencia es inversamente proporcional a la dosis (IAEA, Radiation Protection of Patients).

Otro aspecto importante en la génesis de cataratas, es la irradiación constante a bajas tasas de dosis. En Taiwán, habitantes de un complejo edilicio donde el hierro utilizado en la construcción de los edificios y escuelas estaba contaminado con ^{60}Co , se demostró un aumento significativo de alteraciones en el cristalino en los menores de 20 años, mientras que en los otros dos grupos, (entre 20 y 40 años y mayores de 40 años), los resultados no fueron estadísticamente significativos (Chen 2001, Hsieh 2010).

Una conclusión que surge de este estudio, es que posiblemente no exista umbral para la formación de opacidades en el cristalino ya que las bajas tasas de dosis y bajas dosis pueden ser responsables de la aparición de cataratas en individuos jóvenes.

La posible inexistencia de umbral también es compartida por Chodick y colaboradores (Chodick 2008) luego de los estudios realizados en radiólogos y personal de apoyo.

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 (NCRP 1993) y la International Commission on Radiological Protection (ICRP 1991), se basaban en la presunción de que las cataratas eran el resultado de un efecto inducido por la radiación, de tipo determinístico y que aparecían solo si se superaba un cierto umbral de dosis.

Según la ICRP 103 (2007), hasta el año 2010, el umbral de dosis absorbida para inducción de cataratas en trabajadores ocupacionalmente expuestos, estaba comprendido 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 de 15 mSv/año. Sin embargo, estudios epidemiológicos recientes han suscitado dudas sobre estos valores (Ainsbury 2009).

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 (Wakeford 2009). 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 (ICRP statement 2011). Un valor similar de umbral fue propuesto por el German Radiation Protection Board (SSK) en su documento N° 234 (SSK 2009).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, los objetivos de este trabajo fueron: a) determinar las condiciones para la obtención de cultivos de células germinales del cristalino porcino, b) establecer las condiciones de irradiación con bajas tasas de dosis de radiación beta, c) analizar la sobrevida y las alteraciones morfológicas celulares inducidas por la radiación beta d) analizar las alteraciones estructurales de las fibras de cristalinos irradiados con radiación gamma.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cultivo de células germinales

Los cristalinos fueron extraídos a partir de ojos de cerdo cedidos por el frigorífico EXPORK S.A., dentro de las 5 horas de sacrificados. Fueron triturados en una solución de tripsina 0,25%, centrifugados y las células germinales aisladas fueron cultivadas con medio MEM con 20% de suero fetal bovino.

2.2. Irradiación del cristalino para estudio de microscopia electrónica

Los cristalinos fueron trasladados al Instituto Oncológico Ángel Roffo donde se irradiaron incluidos en la anatomía natural del ojo (ojos enteros), con rayos gamma a diferentes dosis: 2, 5 y 10 Gy a una tasa de dosis aproximada de 1,25 Gy/min. En el momento de las irradiaciones los ojos enteros se ubicaron dentro de un recipiente de polipropileno de manera de orientarlos verticales y perpendiculares al haz de rayos gamma en atmósfera húmeda provista por paños saturados en solución fisiológica.

2.3. Análisis morfológico por microscopia electrónica de barrido de cristalinos

Una vez irradiados se sometieron a un protocolo de deshidratación gradual por inmersión en soluciones sucesivas de concentraciones crecientes de etanol y posteriormente se sometieron las muestras a un protocolo de fijación basado en glutaraldehído al 2,5% y formalina al 4%. Una vez fijados los cristalinos se sometieron a cortes con diferentes orientaciones de manera de exponer las superficies de las fibras de la matriz del cristalino, en su porción subcapsular posterior, tanto en orientación transversal como longitudinal.

2.4. Irradiación con radiación beta

Los cultivos de células germinales (10^4 células) fueron irradiados con una fuente de ^{32}P con una tasa de dosis de 15 mGy/hora para dosis finales de 0,35 Gy, 0,76 Gy, 1,35 Gy y 2 Gy.

La irradiación se realiza superponiendo el frasco con células al que contiene la solución con ^{32}P con una actividad de 120 uCi

3. RESULTADOS

3.1. Cultivos de células germinales: estudio morfológico

Luego de un periodo de 6-7 días de cultivo, las células comenzaron a dividirse con un periodo de duplicación celular de aproximadamente 40-50 horas. Las células adoptan una morfología epitelial, llegando a formar una monocapa (Figura 1 a y b)

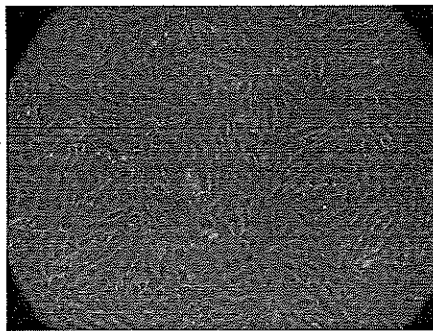


Figura 1 a. Monocapa de células germinales
Magnificación 40 X

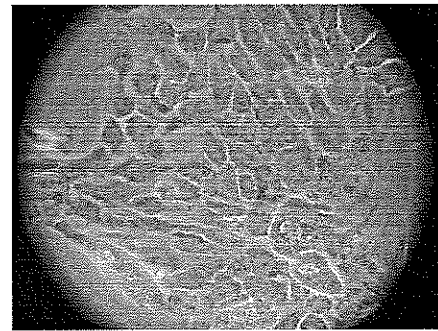


Figura 1 b. Detalle con magnificación 100 X

3.2. Irradiación de los cultivos celulares

Los cultivos fueron irradiados de forma crónica hasta obtener las dosis de 0,35 Gy, 0,76 Gy, 1,35 Gy y 2 Gy. A los 10 días post irradiación, no se observó diferencias significativas en el número final de células entre los controles y los irradiados con 0,35 y 0,76 Gy, por el contrario las diferencias fueron significativas para los que recibieron dosis mayores.

Con dosis de 2 Gy, al finalizar el período de irradiación observaron células con aspecto estrellado, con prolongaciones citoplasmáticas y una disminución de la velocidad de crecimiento, llegando a un estado de senescencia luego de 7 días post irradiación. Figura 2



Figura 2 Células irradiadas con 2 Gy con radiación beta

3.3. Microscopia electrónica de barrido

Las imágenes preliminares de las fibras integrales de la matriz correspondiente a la porción subcapsular posterior del cristalino muestran una configuración regular y ordenada que se corresponde con la anatomía normal del órgano, sin evidenciar, en las condiciones ensayadas, alteraciones a nivel de estructura.

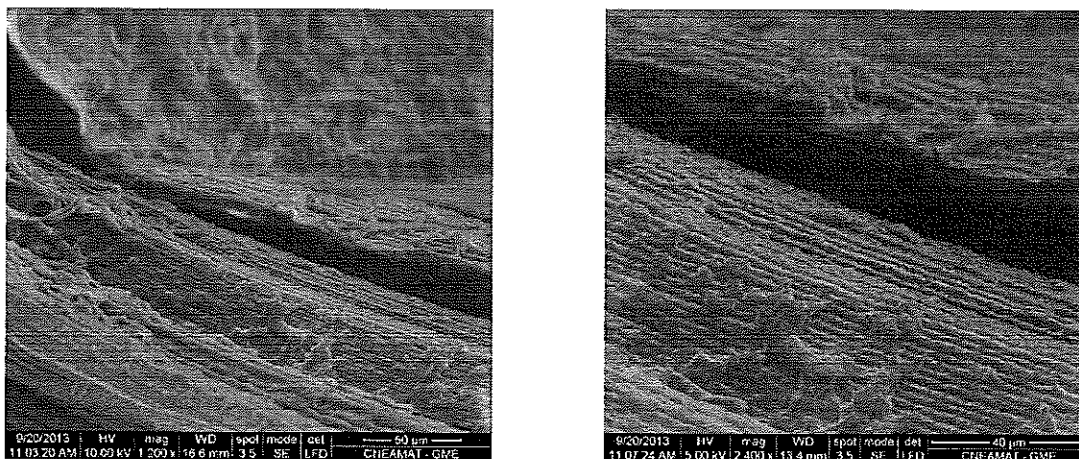


Figura 3: Micrografías donde se aprecia el grado de detalle con el que este modelo permite estudiar las alteraciones a nivel de las fibras en el cristalino. En las imágenes se observan en detalle las fibras de una porción de la región subcapsular posterior de un cristalino.

4. CONCLUSIONES

Se ha demostrado que la opacidad generada por bajas dosis y bajas tasas de dosis de radiación ionizante, puede llegar a manifestarse clínicamente luego de muchos años. Por el contrario, altas dosis y tasas de dosis inducen la opacidad en tiempos relativamente cortos. Esto plantea la posibilidad de la existencia de un mecanismo estocástico o determinístico. Consideramos que la continuación y ampliación de este tipo de estudios contribuirán a conocer aspectos básicos de la radiosensibilidad a bajas tasas de dosis de las células germinales del cristalino y de este modo, poder aportar información para discernir cuál de estos mecanismos o ambos simultáneamente, pueden ser los responsables de la génesis de las cataratas inducidas por radiaciones ionizantes. La existencia de uno u otro mecanismo, podría tener implicancia en la determinación de los límites de dosis y umbrales fijados para trabajadores ocupacionalmente expuestos y público en general.

Agradecimientos: Se agradece la colaboración del Dr. Daniel A. Vazquez y Dr. Ricardo Lavera del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) y a las autoridades de la industria frigorífica EXPORK S.A. por la provisión de los ojos de porcino. Asimismo a los integrantes del servicio de Radioterapia del Instituto Angel H. Roffo por la irradiación de las muestras.

5. REFERENCIAS

Abraham AG, NG Condon, EW Gower. The new epidemiology of cataract. *Ophthalmol. Clin. North Am* (2006); 19: 415–425.

Ainsbury EA, Bouffler SD, Dorr W, Graw J, Muirhead CR, Edwards AA, Cooper J. Radiation cataractogenesis: a review of recent studies. *Radiat. Res.* (2009); 172: 1–9.

Asbell PA, I Duolan, I Mindel, D Brocks, M Ahmad, S Epstein. Age-related cataract. *Lancet* (2005); 365: 599–609.

Chen WL, Hwang JS, Hu TH, Chen MS, Chang WP. Lenticular opacities in populations exposed to chronic low-dose-rate gamma radiation from radiocontaminated buildings in Taiwan. *Rad. Res.*(2001); 156: 71–77.

Chodick G, Bekiroglu N, Hauptmann M, Alexander BH, Freedman DM, Doody MM, Cheung LC, Simon SL, Weinstock RM, Bouville A. et al. Risk of cataract after exposure to low doses of ionizing radiation: a 20-year prospective cohort study among US radiologic technologists. *American journal of epidemiology*, (2008); 168: 620–631.

Henderson MA, Valluri S, Garrett J, Lopez JT, Caperell-Grant A, Mendonca MS, Rusek A, Bigsby RM, Dynlacht JR.. Effects of estrogen and gender on cataractogenesis induced by high-LET radiation. *Radiat. Res.* (2010); 173: 191-196.

Hsieh WA, Lin IF, Chang WP, Chen WL, Hsu YH, Chen MS. Lens opacities in young individuals long after exposure to protracted low-dose-rate gamma radiation in ⁶⁰Co-contaminated buildings in Taiwan. *Radiat. Res.* (2010); 173; 194-204.

IAEA, Radiation Protection of Patients, radiation and cataract. <https://rpop.iaea.org/RPOP/RPoP/Content/Index.htm>

ICRP. Publication 60. Oxford: Pergamon Press; (1991). The 1991 Recommendations of International Commission on Radiological Protection.

ICRP. Publication 103. Oxford: Pergamon Press (2007). The 2007 Recommendations of International Commission on Radiological Protection.

ICRP statement (2011).

McCarty, C. A. and H. R. Taylor. A review of the epidemiologic evidence linking ultraviolet radiation and cataracts. *Dev. Ophthalmol* (2002); 35: 21–31.

NCRP. Report 116. Bethesda, MD: National Council on Radiation Protection and Measurements; 1993. Limitation of exposure to ionizing radiation.

Roodhooft, J. M. J. Leading causes of blindness worldwide. *Bull. Soc. Belge Ophthalmol* (2002); 283: 19–25.

SSK German Radiation Protection. 2009; Document N° 234

Wakeford R. Radiation in the workplace-a review of studies of the risks of occupational exposure to ionising radiation. *J Radiol Prot.* (2009); 29: A61-79.

West, S. Epidemiology of cataract: accomplishments over 25 years and future directions. *Ophthalmic Epidemiol* (2007): 14:173–178.

Wilde, G. and J. Sjostrand. A clinical study of radiation cataract formation in adult life following γ irradiation of the lens in early childhood. *Br. J. Ophthalmol* (1997); 81: 261–266.

Wolf N, Pendergrass W, Singh N, Swisshelm K, Schwartz J. Radiation cataracts: mechanisms involved in their long delayed occurrence but then rapid progression. *Mol Vis.* (2008); 14: 274-285.

Worgul BV, Merriam GR Jr, Medvedovsky C. Cortical cataract development--an expression of primary damage to the lens epithelium. *Lens Eye Toxic Res.* (1989); 6: 559-571.



Influencia de la dosis y tasa de dosis de radiación beta y gamma en el proceso de opacidad del cristalino "in vitro"

Autoridad Regulatoria Nuclear - Buenos Aires - ARGENTINA

INTRODUCCIÓN

Las cataratas son la causa más frecuente de ceguera a nivel mundial. Se estima que en el mundo, 25 millones de personas padecen esta patología.

El cristalino es un órgano muy sensible a las radiaciones ionizantes. Se ha observado un aumento de la incidencia de cataratas en los sobrevivientes de Hiroshima, Nagasaki y Chernobyl, en adultos y niños irradiados por prácticas médicas, en médicos intervencionistas, en pilotos de líneas comerciales y astronautas.

El proceso de opacidad por radiación, se genera en la superficie anterior del cristalino. Las células epiteliales germinativas migran hacia la parte subcapsular desarrollando una anormal proliferación y diferenciación. El período de latencia y la severidad depende de la dosis, la tasa de dosis y del fraccionamiento, siendo el período de latencia inversamente proporcional a la dosis.

De acuerdo a estudios epidemiológicos en profesionales y público, posiblemente no exista umbral para la formación de opacidades en el cristalino ya que las bajas tasas de dosis y bajas dosis podrían ser responsables de la aparición de cataratas en individuos jóvenes, por lo tanto, podría considerarse como un mecanismo estocástico.

El objetivo general del proyecto es implementar un modelo de irradiación "in vitro" que permita analizar la radiosensibilidad y alteraciones moleculares de las células germinales del cristalino debido a la irradiación crónica con bajas tasas de dosis de radiación beta y determinar las alteraciones estructurales de las fibras del órgano generadas por radiación gamma.

En el presente trabajo se muestra la obtención de cultivos de células germinales y los resultados preliminares de radiosensibilidad y alteraciones morfológicas por irradiación con radiación beta y gamma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de células germinales: Los cristalininos fueron extraídos a partir de ojos de porcino dentro de las 5 h de sacrificados, digeridos en una solución de tripsina 0,25%, centrifugados y las células germinales aisladas fueron cultivadas con medio MEM con 20% de suero fetal bovino.

Irradiación con radiación beta: Los cultivos de células germinales (10^4 células) fueron irradiados con una fuente de ^{32}P con una tasa de dosis de 15 mGy/hora para dosis finales de 0,35 Gy, 0,76 Gy, 1,35 Gy y 2 Gy. La irradiación se realizó superponiendo el frasco con células al que contiene la solución con ^{32}P con una actividad de 120 uCi.

Irradiación del cristalino para estudio de microscopía electrónica: Los cristalininos fueron irradiados incluidos en la anatomía natural del ojo con dosis de 2, 5 y 10 Gy de radiación gamma con una tasa de dosis de 1,25 Gy/min.

Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido de los cristalininos: Los cristalininos fueron extraídos, deshidratados en etanol y fijados en glutaraldehído al 2,5% y formalina al 4%. Posteriormente se sometieron a cortes con diferentes orientaciones de manera de exponer las superficies de las fibras de la matriz del cristalino, en su porción subcapsular posterior, tanto en orientación transversal como longitudinal.

CONCLUSIONES

Actualmente coexisten principalmente dos teorías para tratar de explicar la génesis de la opacidad del cristalino por radiaciones, una de ellas considera las alteraciones moleculares en las células germinales que modifican el proceso de diferenciación celular y la segunda, alteraciones de las cristalininas, proteínas que constituyen la mayor parte de las fibras del cristalino, lo cual conduce a alteraciones estructurales de las fibras.

En este trabajo se ha podido implementar un modelo de aislamiento, cultivo e irradiación "in vitro" de células germinales del cristalino que permite analizar la radiosensibilidad de estas células a distintas tasas de dosis y dosis finales modificando la actividad de la fuente de radiación de ^{32}P . Por otra parte, esto permite contar con un modelo para el análisis de alteraciones moleculares radioinducidas que conducen al proceso de opacidad.

Se ha podido iniciar el análisis por microscopía electrónica de barrido de la arquitectura normal del empaquetamiento de las fibras del cristalino. Esto permitirá analizar la influencia de la dosis y tasa de dosis en la modificación de dicha estructura que contribuya al proceso de opacidad.

Agradecimientos: al Dr. Daniel A. Vazquez y al Sr. Ricardo Laveria del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) y a las autoridades del establecimiento INDUSTRIA FRIGORÍFICA EXPORT S.A. por el suministro de los ojos de porcino. A los integrantes del servicio de radioterapia del Instituto Ángel H. Roffo por la irradiación de las muestras.

RESULTADOS

Cultivos de células germinales: estudio morfológico

Luego de un período de 6-7 días de cultivo, las células comenzaron a dividirse con un período de duplicación celular de aproximadamente 40-50 horas. Las células adoptan una morfología epitelial, llegando a formar una monocapa (Figura 1 a y b).

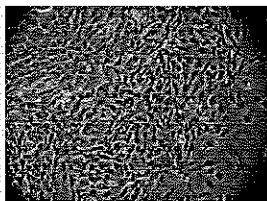


Figura 1a. Monocapa de células germinales. Magnificación 40 X

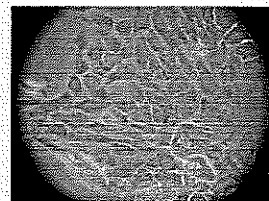


Figura 1b. Detalle con magnificación 100 X

Irradiación de los cultivos celulares

Los cultivos fueron irradiados de forma crónica hasta obtener las dosis de 0,35 Gy, 0,76 Gy, 1,35 Gy y 2 Gy. A los 10 días post irradiación, no se observó diferencias significativas en el número final de células entre los controles y los irradiados con 0,35 y 0,76 Gy, por el contrario las diferencias fueron significativas para los que recibieron dosis mayores.

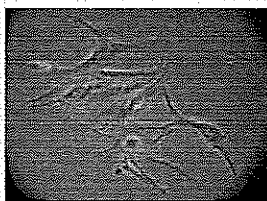


Figura 2. Células irradiadas con 2 Gy

Con dosis de 2 Gy, al finalizar el período de irradiación observaron células con aspecto estrellado, con prolongaciones citoplasmáticas y una disminución de la velocidad de crecimiento, llegando a un estado de senescencia luego de 7 días post irradiación (Figura 2).

Microscopía electrónica de barrido

Las imágenes preliminares de las fibras integrales de la matriz correspondiente a la porción subcapsular posterior del cristalino muestran una configuración regular y ordenada que se corresponde con la anatomía normal del órgano, sin evidenciar, en las condiciones ensayadas, alteraciones a nivel de estructura (Figura 3).



Figura 3. Micrografía donde se aprecia el grado de detalle con el que este modelo permite estudiar las alteraciones a nivel de las fibras en el cristalino. En las imágenes se observan en detalle las fibras de una porción de la región subcapsular posterior de un cristalino.

