

Afiliación Institucional:

¹ Universidad de Costa Rica, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Sede Rodrigo Facio, San José, Costa Rica; Caja Costarricense del Seguro Social, Hospital Tony Facio Castro, Limón, Costa Rica.

 0000-0002-5085-1247

² Universidad de Costa Rica, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Sede Rodrigo Facio, San José, Costa Rica; Universidad de Costa Rica, Escuela de Nutrición, Sede Rodrigo Facio, San José, Costa Rica.

 0000-0003-4104-3261

³ Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Ciencias Atómicas, Nucleares y Moleculares (CICANUM), Sede Rodrigo Facio, San José, Costa Rica.

 0000-0002-8368-7308

⁴ Caja Costarricense de Seguro Social, Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica. Servicio de Radioterapia, San José, Costa Rica.

 0000-0001-8433-8970

⁵ Caja Costarricense de Seguro Social, Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica. Servicio de Radioterapia, San José, Costa Rica.

 0000-0001-7141-6319

⁶ Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones (CPHR), Habana, Cuba.

 0000-0002-0712-9734

⁷ Caja Costarricense de Seguro Social, Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica. Servicio de Radioterapia, San José, Costa Rica.

 0000-0002-0667-9769

⁸ Universidad de Costa Rica, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Sede Rodrigo Facio, San José, Costa Rica.

 0000-0002-1466-4815

⁹ Universidad de Costa Rica, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Sede Rodrigo Facio, San José, Costa Rica.

 0000-0002-8621-1604

Abreviaturas:

ace: fragmentos acéntricos
AS: asociaciones sateliticas
chtb: fracturas cromatídicas
dic: cromosomas dicéntricos
eace: excesos acéntricos
FPG: Giemsa en fluorescencia, por sus siglas en inglés.
r: cromosomas en anillo

Conflictos de interés: Los autores declaran que no hay conflicto de interés

Fuentes de financiamiento:

Todas las fuentes de financiamiento se detallan plena y claramente en la sección de agradecimientos.

✉ cfernandezb05@yahoo.es



Esta obra está bajo una licencia internacional: Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0.

Original

Cromosopatías en pacientes con cáncer sometidos a radioterapia con cobalto 60

(Chromosopathies in cancer patients undergoing cobalt 60 radiotherapy)

Claudia Fernández-Barrero¹, Vanessa Ramírez-Mayorga², Patricia Mora-Rodríguez³, Hugo Recinos-Pineda⁴, Marvin Rodríguez-González⁵, Omar García-Lima⁶, Silvia Rodríguez-Alvarado⁷, Wendy Malespín-Bendaña⁸, Luisa Valle-Bourrouet⁹

Resumen

Objetivo: Describir las aberraciones citogenéticas que pueden ser observadas por medio de la técnica Giemsa en fluorescencia y encontradas en pacientes con cáncer antes y después de ser sometidos a tratamiento con radioterapia.

Métodos: Se analizó un mínimo de 200 metafases en primera división mitótica, antes y después del tratamiento de radioterapia en nueve pacientes que asistieron a la sección de radioterapia del Hospital San Juan de Dios, Costa Rica. En cada caso, se contabilizó cada tipo de cromosopatía por medio de la prueba de Giemsa en fluorescencia y utilizando *bromodeoxiuridina* y naranja de acridina.

Resultados: Las cromosopatías producidas por radioterapia se observaron tanto antes como después del tratamiento; sin embargo, destacó el incremento en la frecuencia de los cromosomas dicéntricos y anillos céntricos una vez finalizada la terapia. La frecuencia de fracturas cromatídicas, de asociaciones sateliticas y de alteraciones morfológicas no se ve afectada por la radioterapia. Uno de los participantes presentó un recuento mitótico bajo.

Conclusión: La radioterapia aumenta significativamente la frecuencia de los cromosomas dicéntricos y dicéntricos más anillos en la muestra en estudio. Este trabajo es relevante por ser el primer estudio en Costa Rica en el que se analizan los cromosomas dicéntricos como biomarcadores de exposición a radiaciones ionizantes, mediante la prueba de Giemsa en fluorescencia y utilizando *bromodeoxiuridina* y naranja de acridina.

Descriptor: Radioterapia, cromosopatía, Giemsa en fluorescencia, irradiación.

Abstract

Aim: The objective of this study was to describe the before and after cytogenetic aberrations found in current patients of radiotherapy. This can be observed through the technique called "Giemsa in fluorescence".

Methods: A minimum of 200 metaphases were analyzed in the first mitotic division in 9 patients. The patients were observed before and after radiotherapy treatment at the San Juan de Dios Hospital in Costa Rica. In each case, any type of chromosomopathy was counted using the "Giemsa in fluorescence" test as well as *Bromodeoxyuridine* and acridine orange.

Results: The chromosomopathies are observed before and after treatment with radiotherapy. The treatment seems to change the frequency, increasing the dicentric

chromosomes, and centric rings after the treatment. The frequency of chromatid fractures, satellite associations, and morphological alterations were not affected by radiotherapy.

Conclusion: The chromosomopathies produced by radiotherapy were observed both before and after treatment with variations in their frequency. After radiotherapy, dicentric chromosomes and dicentric chromosomes plus rings frequencies increased significantly. A low mitotic count was present, this could have been the result of radiation on the bone marrow or by the cell repair and apoptosis system. The standardized “Fluorescence Plus Giemsa” test using Bromodesoxyuridine and acridine orange was used for the first time in Costa Rica. This allowed for the measurement of radiation exposure used in the treatment or detection of diseases and cancer in patients.

Keywords: Radiotherapy, Chromosomopathy, fluorescence plus Giemsa, irradiation.

Fecha recibido: 21 de julio 2021

Fecha aprobado: 13 de octubre 2022

La radiación ionizante (RI) es un proceso en el cual las partículas emitidas por elementos radiactivos son capaces de depositar energía suficiente para desplazar electrones de los átomos por lo que rompen los enlaces químicos y provocan cambios moleculares que dañan las células afectadas.¹ (Organismo Internacional de Energía Atómica. Dosimetría citogenética: Aplicaciones en materia de preparación y respuesta a las emergencias radiológicas. [Internet]. Vienna: OIEA; 2014. [accesado 30-08-2017]. Disponible en: https://wwwpub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/EPR_Biodosimetry_S_web.pdf). Su uso ayuda a mejorar de muchas maneras la calidad de vida de los pacientes tratados con ella, como es el caso de utilización de rayos gamma en radioterapia. Este es una radiación de baja transferencia lineal de energía caracterizada por ser de gran penetrancia, lo que la hace útil en procesos médicos. Sin embargo, por su condición de RI, genera cambios moleculares que pueden repercutir en daños en el ADN, en efectos cancerígenos y cromosopatías.²⁻⁴

Las cromosopatías producidas por este tipo de radiación son inestables ya que, gracias a los mecanismos de reparación génica del ciclo celular, tienden a ser reparadas o, si son irreparables, inducen la entrada a apoptosis.³ Entre las cromosopatías observables encontradas en pacientes después de aplicársele radioterapia en diferentes tipos de cáncer⁴, se encuentran los cromosomas dicéntricos (dic), cromosomas en anillo (r) y excesos acéntricos (eace). Aunque la radioterapia puede producir diversas cromosopatías, las más características

son los dic, marcadores más utilizados por ser fáciles de analizar y porque su frecuencia basal en población sana y sin haber sido irradiada ronda de uno a dos por cada mil células analizadas. Sin embargo, la frecuencia de cada tipo de alteración cromosómica y su distribución por célula dependen de la dosis, la sensibilidad del paciente y del tipo de célula que va a ser sometida a la irradiación.⁵ Los linfocitos tienden a ser muy sensibles a la radiación y en la mayoría de los casos su exposición provoca apoptosis o bien la inducción de diversas cromosopatías.⁷ (International Atomic Energy Agency. Accidental overexposure of radiotherapy patients in Białystok. [Internet] Vienna: IAEA; 2004. [accesado 30-08-2017]. Disponible en: https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/Pub1180_web.pdf).

Se espera que un paciente con tratamiento inicial de radioterapia no presente aberraciones inestables antes del tratamiento, a menos que haya estado en un esquema previo de tratamiento con radioterapia, debido a que las aberraciones inestables desaparecen con el tiempo y pueden observarse hasta dos años después de haber sido expuesto el paciente.⁷

De los 5 000 casos nuevos de cáncer que se informan al año en Costa Rica, 2 000 son sensibles a radioterapia, y de estos, alrededor de 700 (14%) son tratados con ella (Caja Costarricense del Seguro Social. Informe Institucional sobre el cáncer en Costa Rica. [Internet]. San José: CCSS; 2001. [accesado 30-8-2017]. Disponible en: <https://www.binasss.sa.cr/opac-ms//media/digitales/>

Informe%20institucional%20sobre%20el%20c%3%A1ncer%20en%20Costa%20Rica.%20CCSS.pdf). Además, según el documento Incidencias 2014, de estadísticas y bases de datos del Ministerio de Salud, 2014, “Este valor crece con el tiempo ya que para el 2014 se informaron el doble de nuevos casos, 10 906, y siguiendo el patrón del 2001, se espera que aumente el número de pacientes tratados con este método de radiación” (Ministerio de Salud. Incidencia 2014 diferentes características. Versión:1. [Internet]. San José: MS; 2016. [accesado 29-9-2017]. Disponible en: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos-left/documentos-ministerio-de-salud/material-informativo/material-publicado/estadisticas-y-bases-de-datos/estadisticas-y-bases-de-datos-vigilancia-de-la-salud/estadisticas-vigilancia-de-la-salud/estadistica-de-cancer-registro-nacional-tumores/incidencia/1692-incidencia-2014-diferentes-caracteristicas/file>).

Se ha observado en diversos estudios que la irradiación produce dic y r y que conforme aumenta la dosis irradiada aumenta el número de estas cromosopatías.^{4,6,8-12} Ramesh y Bhargava¹⁶ realizaron un estudio en cuatro pacientes antes de realizarles cualquier tratamiento contra el cáncer y encontraron que el porcentaje de anomalías cromosómicas como los dic, ace, r, lagunas cromatídicas (chtg), fracturas cromatídicas (chtb) y dobles minutas (dmin) es muy bajo, siendo lo máximo siete dic en un paciente en 222 metafases. Venkatachalam y colaboradores¹⁷ realizaron un estudio sobre efectos cromosómicos antes del tratamiento con radioterapia y quimioterapia en pacientes con cáncer, comparándolo con un grupo control de pacientes sanos y encontraron que el valor observado de dic es mayor en los pacientes, aun cuando no existen registros de haber sido expuestos a radioterapia o quimioterapia antes. Sin embargo, Gil y otros investigadores¹⁸ demuestran en 22 pacientes de cáncer de tiroides que no existe un incremento de anomalías como dicéntricos o micronúcleos antes del tratamiento con respecto a un grupo control de pacientes sanos. Gershkevitch y sus compañeros⁷ realizaron un estudio en pacientes con cáncer de próstata y endometrio y hallaron que el número de dic aumenta conforme el volumen o área irradiada aumenta. También se ha observado que el número de aberraciones cromosómicas incrementa conforme va aumentando el número de sesiones de radioterapia recibidas por el paciente.¹⁵

En Costa Rica no existe ningún estudio registrado en el campo de la dosimetría para radiaciones ionizantes que utilice la citogenética u otro marcador biológico. En 1996, ocurrió un accidente en el Hospital San Juan de Dios por el cual se sobreirradió con cobalto a 115 pacientes con cáncer; se estima que 17 de ellos murieron en los dos años siguientes por esa causa (Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). Sobreexposición accidental de pacientes de radioterapia en San José (Costa Rica). [Internet]. Vienna: OIEA; 1999. [accesado 30-8-2017]. Disponible en: https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/P027s_scr.pdf). Es por esto que existe la necesidad de realizar investigación en el campo de la dosimetría biológica, para entender mejor el comportamiento de las cromosopatías producto de la radiación *in vivo*. El objetivo de este trabajo fue analizar las cromosopatías observadas antes y después de radioterapia en pacientes con cáncer tratados en el Hospital San Juan de Dios, así como implementar en Costa Rica, por primera vez, el ensayo dicéntrico utilizando la técnica de tinción de Giemsa en fluorescencia (FPG, por sus siglas en inglés).

Materiales y métodos

Participantes: Participaron nueve pacientes del servicio de radioterapia del Hospital San Juan de Dios entre los años 2014 y 2016. La escogencia de los pacientes se realizó según el esquema de radioterapia convencional (1.8-2 Gy/día, cinco días a la semana por cinco a ocho semanas aproximadamente) o hipofraccionamiento (dosis fraccionadas más grandes que las utilizadas en la radioterapia convencional, administradas de 5 a 15 días). Este manuscrito forma parte del proyecto 742-B0-304, “Verificación Biológica de la dosis recibida en pacientes tratados con radioterapia del Hospital San Juan de Dios”, proyecto aprobado por el Comité Local de Bioética del Hospital San Juan de Dios (HSJD) con el número CLOBI-HSJD-005-2010 y por el Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica (oficio: VI-7869-2010). Todos los participantes en el estudio firmaron un formulario de consentimiento informado. No se realizó ningún cambio en el tratamiento de los pacientes. El radioterapeuta llevó un cuidadoso registro de todos los detalles del tratamiento de cada uno de los pacientes.

Criterios de inclusión y de exclusión: Se incluyó en el estudio a pacientes de ambos sexos, mayores de edad (sin límite superior de edad) con diferentes tipos de tumores malignos. Se excluyó a las personas que, por criterio del médico tratante, estaban en un estado de salud tal que no permitía la flebotomía.

Toma de la muestra: A cada participante se le tomaron dos muestras de sangre periférica (5 mL en tubos Vacutainer con heparina sódica liofilizada) mediante flebotomía convencional. Una muestra se recolectó antes del inicio del esquema de radioterapia y la segunda el día de la última sesión de radiación.

Recolección de datos: Se incluyeron datos sobre características de tipo de cáncer y del paciente, tales como sexo, edad, antecedentes de enfermedades virales, tratamientos de radioterapia o quimioterapia previos, exposición a medios contaminados (agroquímicos), hábitos de fumado y toma de medicamentos; esto para tener en cuenta otros agentes químicos, físicos o biológicos que pueden producir anomalías cromosómicas.

Cultivo y cosecha de linfocitos: Se utilizó el protocolo para cromosomas dicéntricos del *Cytogenetic Dosimetry Application in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies*. (International Atomic Energy Agency. Cytogenetic dosimetry application in preparedness for and response to radiation emergencies. [Internet]. Vienna, IAEA; 2011. [accesado 30-8-2017]. Disponible en: https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/EPR-Biodosimetry%202011_web.pdf).

Tinción: Se empleó el método Giemsa en fluorescencia (FPG) utilizando BrdU y naranja de acridina.¹⁴ Para la estandarización del método se contó con el apoyo del Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones (CPHR), Habana, Cuba, referentes regionales en estudios citogenéticos asociados a las radiaciones ionizantes.

La BrdU es un agente intercalante análogo de la timidina que establece enlaces con bases nitrogenadas y ayuda a la distinción entre cromátidas monosustituidas y bisustituidas (Fig. 1), lo que permite la diferenciación de las cromátidas hermanas por microscopía óptica convencional de la primera división mitótica (M1) de la segunda (M2),¹⁵ de manera que el conteo dic es más exacto,

ya que se pueden perder en la segunda división mitótica, por ser una cromosopatía inestable.

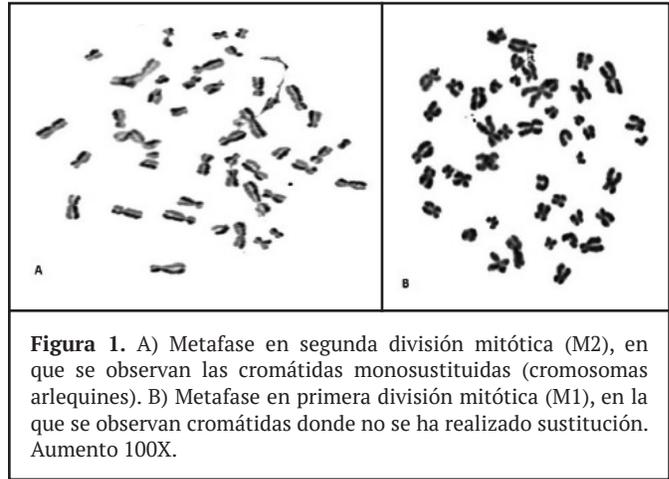


Figura 1. A) Metafase en segunda división mitótica (M2), en que se observan las cromátidas monosustituidas (cromosomas arlequines). B) Metafase en primera división mitótica (M1), en la que se observan cromátidas donde no se ha realizado sustitución. Aumento 100X.

Análisis: Se analizaron solo las metafases con 45 a 47 centrómeros. Se contó el número de cromosomas, la cantidad de dic, fragmentos acéntricos (ace), r, eace y cualquiera otra cromosopatía visible en cada metafase de acuerdo con los siguientes criterios para el análisis citogenético:

- Los dic y r se tomaron en cuenta cuando estuvo presente su respectivo ace.
- Las metafases con dic y su respectivo ace deben contar 46 cromosomas, en cambio las metafases con r con su correspondiente ace deben contar 47 cromosomas.
- Las aberraciones tricéntricas equivalen a dos dic y deberán aparecer dos ace.
- Los ace no asociados a dic o r se contaron como eace.
- Dmin, r y excesos acéntricos fueron tomados como eace.
- Se contabilizó toda otra cromosopatía encontrada, distinguible al microscopio en tinción convencional y se clasificó como anomalía cromosómica (AM).

Se analizaron como mínimo 200 metafases antes y 200 metafases después de terminado el esquema de tratamiento con radioterapia; todas las metafases analizadas se encontraban en Metafase I. Para el análisis, se utilizaron los microscopios Olympus CX-31 y Olympus CX-51.

Análisis estadístico: Para cada paciente se obtuvo la frecuencia de cada cromosomopatía encontrada y se compararon las frecuencias antes y después de cumplido el esquema de tratamiento. En los casos en que los pacientes presentaron el mismo tipo de cáncer y fueron irradiados en la misma zona, se compararon las frecuencias de las cromosomopatías. Se realizó el análisis no paramétrico de la prueba U de Mann Whitney para análisis de correlación utilizando SPSS versión 19 de IBM.

Resultados

En el Cuadro 1 se presentan las características clínico-patológicas de los nueve participantes; cinco de ellos recibieron quimioterapia previa, el participante dos recibió simultáneamente quimioterapia y

radioterapia previa. Cuatro de los nueve participantes en estudio presentaron cáncer de mama.

Antes de la radioterapia se encontraron conteos de cero a ocho dic y se observó un aumento de dic después de la radioterapia (de tres a 22 dic) en todos los casos (Cuadro 2, Fig. 2a). Además, se observaron r (Fig. 2b), ace (Fig. 2c), fracturas cromatídicas (chtb) (Fig. 2d) y asociaciones sateliticas (AS) (Fig. 2e). Cualquier alteración de tamaño o aneuploidia de algún cromosoma, se contabilizó como alteración morfológica (AM). Uno de los participantes presentó un 19 % de sus metafases sin un cromosoma del grupo G. Solo se observó un tricéntrico en un paciente. Uno de los participantes fue sujeto a quimioterapia un mes antes de la radioterapia; entre los medicamentos con que fue tratado resaltan el paclitaxel (taxol) y el docetaxel (Cuadro 1).

Cuadro 1. Datos demográficos, enfermedad y tipo de tratamiento de cada paciente participante en la investigación (n= 9)

P	Edad	Sexo	Dosis total impartida (Gy)	Tipo de radioterapia	Tipo de cáncer	QP**	Medicamentos	Otras enfermedades
1	72	F	46	Convencional	Mama	No	Insulina, Metformina	Diabetes, HTA
2	53	F	50	Convencional	Mama	Sí	Trastuzumab Anastrozole Dextrometorfano	NI
3	68	F	45	Convencional	Mama	Sí	Taxol, FEC, Docetaxel, Caboplastino, Trastuzumab	NI
4	54	F	46	Convencional	Mama	Sí	RET, Amicodex	Hernia de disco
5	88	M	30	Hipofraccionamiento	Próstata con metástasis ósea	No	Bicalutamida, Zoledronato Enalapril, Flutamina	NI
6	50	M	46	Convencional	Cérvix	Sí	Diclofenaco sódico Dexametasona Antihemorroidales, Piridium	Bocio multinodular
7	60	M	30	Hipofraccionamiento	Melanoma metastásico	No	Prednisona, hexametasona	Radiodermatitis
8	63	F	30	Hipofraccionamiento	Carcinoma epidermoide de tejido blando inguinal	No	Procalcitonina, oxacilina Ciprofloxacina, Metformina	Diabetes
9	17	M	30	Hipofraccionamiento	Linfoma de Hodgkin	Sí	Cefalexina, Amoxicilina	Adenopatía

Datos demográficos, enfermedad y tipo de tratamiento de cada paciente participante en la investigación (n= 9)

P= participante, **QP= quimioterapia, F= femenino, M= masculino, FEC= fluoracilo, epirrubicina, ciclofosfamida, RET= tratamiento contra el protooncogén RET, NI= no indica, HTA= hipertensión arterial.

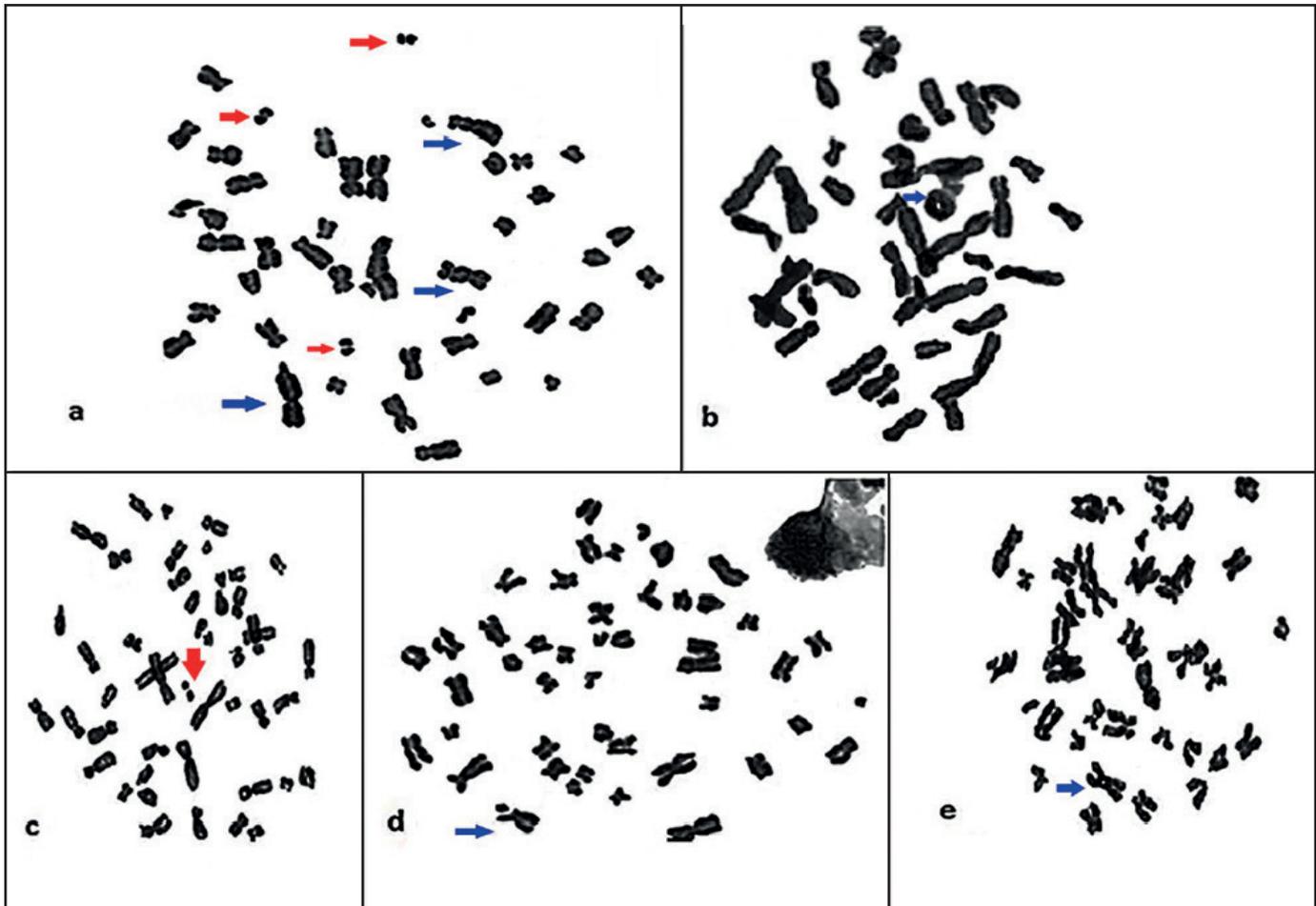


Figura 2. Cromosopatías observadas en el análisis a los pacientes con cáncer que recibieron radioterapia (la flecha roja señala los ace; las otras cromosopatías están señaladas con flechas azules): a) cromosomas dicéntricos, fragmentos acéntricos (ace) b) un cromosoma en anillo (r), c) un ace, d) una fractura cromatídica(chtb), e) una asociación satelítica (AS).

Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el conteo antes y después de dic ($p < 0.05$) y un aumento después de la radioterapia para cada participante (Cuadro 2). Este mismo comportamiento se observa al analizar en conjunto los dic y los r y todos los datos a excepción de AS (Cuadro 2). Se excluye de este análisis al paciente cuatro, debido a que no se alcanzó el número de metafases requeridas para el análisis (200 metafases). En el caso de las AS se advirtió que solo en los casos de los participantes uno y seis (Cuadro 2) existe una diferencia significativa entre el conteo antes y después de la radioterapia, en el que se detectó, al igual que en las otras comparaciones, un aumento de AS después de la radioterapia.

Uno de los participantes es un agricultor, por lo que muy probablemente estaba ocupacionalmente expuesto a plaguicidas (Cuadro 1), aunque al

momento de la entrevista no indica el tiempo de trabajo como agricultor, tampoco los químicos a los que estuvo expuesto, por lo que no se puede ahondar más sobre el efecto específico de los plaguicidas en él. Quienes presentaron anomalías morfológicas antes de la radioterapia fueron pacientes con cáncer de mama (Cuadro 2).

El índice mitótico para el participante cuatro fue de cero antes de la radioterapia, ya que no se encontraron metafases (razón por la que se le excluyó del análisis estadístico); es importante aclarar que en el material analizado de este participante se observaron núcleos de linfocitos, lo que descarta una falla técnica a la hora del cultivo. Además, este participante, al momento de la toma de la primera muestra, se encontraba en tratamiento con quimioterapia.

Cuadro 2. Frecuencia de alteraciones morfológicas encontradas en nueve participantes antes y después de la radioterapia con cobalto 60

N	Muestra	NM	dic	dic+r	dic+r+ace+AM+chtb	AS	chtb
1	Antes	560	0	0	0.02	0.02	0.01
	Después	432	0.06	0.06	0.13	0	0.02
p			< 0.05*	<0.05*	<0.05*	<0.05*	0.177
2	Antes	402	0	0	0.02	0.01	0.01
	Después	464	0.02	0.02	0.06	0.02	0.01
p			0.008*	0.008*	0.001*	0.418	0.860
3	Antes	426	0.005	0.005	0.04	0.02	0.02
	Después	276	0.02	0.03	0.09	0.02	0.03
p			0.035*	0.016*	0.003*	0.756	0.530
5	Antes	428	0	0	0.02	0.01	0.01
	Después	315	0.04	0.04	0.11	0.02	0.02
p			<0.05*	<0.05*	<0.05*	0.422	0.426
6	Antes	445	0	0	0.02	0.02	0.01
	Después	316	0.03	0.03	0.09	0	0.02
p			<0.05*	<0.05*	<0.05*	0.026	0.371
7	Antes	482	0.02	0.02	0.07	0.01	0.02
	Después	317	0.07	0.07	0.17	0.02	0.01
p			<0.05*	<0.05*	<0.05*	0.396	0.167
8	Antes	459	0	0	0.02	0.002	0.004
	Después	402	0.02	0.03	0.08	0.004	0.01
p			<0.05*	<0.05*	<0.05*	0.446	0.280
9	Antes	472	0	0	0.02	0.002	0.01
	Después	423	0.04	0.04	0.10	0.01	0.02
p			<0.05*	<0.05*	<0.05*	0.142	0.299

N= participante, p= probabilidad, NM= número de metafases analizadas, dic= dicéntrico, r= anillo, ace= fragmento acéntrico, AM= anomalías morfológicas, AS= asociación satelítica, chtb= fractura cromatídica.

Discusión

Después de la radioterapia es común observar dic, ace, r, translocaciones y deleciones¹⁵, ya que la radiación por cobalto 60 es clastógeno S-independiente.^{4, 9, 10, 12, 16--23, 31} Rondón, Caicedo y Robledo (2006)³⁰ encuentran en sus estudios que en pacientes de cáncer de mama en distintos estadios

es posible observar alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica, ya sean numéricas o estructurales, como deleciones, derivados, duplicaciones, translocaciones y dic, lo cual coincide con lo observado en esta investigación.

La frecuencia aumentada de dic antes de la radioterapia hallada en nuestra investigación y se ha informado en otros estudios, en los que se demuestra

un aumento de dic en pacientes con distintos tipos de cáncer; este aumento se atribuye al efecto de un virus o algún mutágeno (p. ej., medicamentos para la quimioterapia, diabetes, osteoporosis o plaguicidas).^{1,3,24} En relación con los medicamentos, se conoce que el taxol tiene capacidad genotóxica en humanos, ratones y *Drosophila* sp., tanto en células somáticas como en células germinales.^{25,26} El docetaxel es genotóxico en humanos, pues produce un aumento de micronúcleos (MN) y dic.²⁷ Además, se ha observado que el topotecano, componente del tratamiento RET, produce una disminución drástica del índice mitótico desde las 24 h después de su administración en células de ratón.³⁵ En modelos animales existe evidencia de que la metformina provoca rupturas cromosómicas en células de ovario de hámster chino;³² sin embargo, no hay reportes de efectos genotóxicos en humanos. También se ha documentado que el zoledronato produce rupturas en el ADN *in vitro* en tres líneas de cáncer (MDA-MB-231, Hs 578T y MCF-7).³⁰

Gentile, Bernardi, Bosch, Mañas y Aiassa (2016)²⁸ indican una asociación estadísticamente significativa entre la frecuencia de MN y aberraciones cromosómicas (incluyendo dic) en personas expuestas a plaguicidas en comparación con una población control.

Las AS, de acuerdo con la literatura, se han observado tanto en poblaciones sanas como en pacientes de cáncer y consumidores de tabaco.³⁴ No obstante, en este estudio, alrededor del 2 % de las metafases observadas presentan AS, lo cual es mucho menor a lo notado en poblaciones sanas; se desconocen la causa y las implicaciones biológicas de este hallazgo.

Un participante del sexo masculino presentó una pérdida del 19% de un cromosoma del grupo G. Es conocido que en hombres sanos mayores de 60 años puede presentarse una pérdida del cromosoma Y, ya sea en la totalidad de las metafases o en forma de mosaico en células de sangre periférica,³⁵⁻³⁷ lo que explicaría lo reportado en este estudio.

Dentro de los alcances de esta investigación, podemos concluir que las cromosopatías producidas por radioterapia se observan tanto antes como después del tratamiento. En el caso de los dic y r, lo que cambia es su frecuencia, la cual aumenta después del tratamiento. Los pacientes con cáncer de mama presentan el mismo tipo de cromosopatía

que los demás participantes y se advierte un aumento significativo de dic después de la radioterapia. Todos estos hallazgos son congruentes con la exposición a la radiación por cobalto 60.

En lo que respecta a las chtb, AS y alteraciones morfológicas, su frecuencia no se ve afectada por la radioterapia. El bajo recuento mitótico del paciente cuatro pudo ser producido por efecto de la radiación en la médula ósea o por el propio sistema de reparación celular y apoptosis y, en algunos casos, por la genotoxicidad producida por tratamientos previos (quimioterapia, medicamentos contra la diabetes).

Este estudio presenta la limitación de no tener como objetivo una clasificación general de anomalías cromosómicas por tipo de cáncer, para lo que sería necesario realizar técnica de bandeado GTG en estudios posteriores que permita catalogar el tipo específico de aberración cromosómica presentada en estos pacientes. En lo futuro, se recomienda realizar estas investigaciones en pacientes con el mismo diagnóstico y, de ser posible, con el mismo esquema de tratamiento, de manera que las incertidumbres producidas por las diferencias antes mencionadas entre los participantes del estudio no obstaculicen las conclusiones debido a las distintas características para cada tipo de cáncer, que produce una fisiopatología y evolución distintas, así como por las diferencias en el tratamiento y de la zona del cuerpo irradiada.

Un aporte adicional fue la implementación de la técnica Giemsa más fluorescencia utilizada en el ensayo de cromosomas dicéntricos (dic), utilizado actualmente en el Servicio de Dosimetría Biológica del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA). Este ensayo sirve para estimar dosis recibidas en personas en las que se sospecha de sobreexposición a radiaciones. Esta investigación, al ser la primera realizada en Costa Rica, abre un camino para futuras investigaciones en el tema de la radioterapia y el uso de los cromosomas dicéntricos como biomarcadores asociados a las radiaciones ionizantes que nos ayuden a comprender mejor esta área de la ciencia.

Agradecimientos y colaboradores

Esta investigación fue financiada por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. Agradecemos a la Dra. Isabel

Castro Volio (q.e.p.d.), al personal del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) y del Laboratorio de Citogenética por el apoyo para realizar el análisis del material en sus instalaciones; a Nelson Brenes Obando, por toda la ayuda brindada y apoyo técnico para la ejecución de los procedimientos; al personal del servicio de Radioterapia del Hospital San Juan de Dios y al Sr. Fernando Ortiz Morales por el mejoramiento de la resolución de las imágenes.

Referencias

1. Puerta-Ortiz J, Morales-Aramburo J. Efectos biológicos de las radiaciones ionizantes. *Rev Colomb Cardiol.* 2020; 27: 61-71. DOI:10.1016/j.rccar.2020.01.005.
2. Piotrowski I, Kulcenty K, Suchorska W, Skrobała A, Skórska M, Kruszyna-Mochalska M, *et al.* Carcinogenesis induced by low-dose radiation. *Radiol Oncol.* 2017; 51:369-377. DOI: 10.1515/raon-2017-0044.
3. Pandey M, Raghavan SC. DNA double-strand break repair in mammals. *J Radiat Cancer Res.* 2017; 8:93-97. DOI:10.4103/jrcr.jrcr_18_17.
4. Manivannan B, Kuppusamy T, Venkatesan S, Perumal V. A comparison of estimates of doses to radiotherapy patients obtained with the dicentric chromosome analysis and the γ -H2AX assay: Relevance to radiation triage. *Appl Radiat Isot.* 2018; 131:1-7. DOI: 10.1016/j.apradiso.2017.10.031.
5. López B, Sáenz SM, Ruiz MJ. Dosimetría biológica: principios y utilidad. *Radiobiol.* 2008; 8:186-189.
6. Yashavardhan MH, Kumar S, Kumar A, Suar, M. Response of normal cells following multiple radiation exposure under radiotherapy setting. *Def Life Sci J.* 2017; 2: 335-342. DOI: 10.14429/dlsj.2.11667.
7. Gershkevitsh E, Hildebrandt G, Wolf U, Kamprad F, Realo, E, Trott K. Chromosomal aberration in peripheral lymphocytes and doses to the active bone marrow in radiotherapy of prostate cancer. *Strahlenther Onkol.* 2002; 178: 36-42. DOI: 10.1007/s00066-002-0886-y.
8. Antoine JL, Gerber GB, Leonard A, Richard F, Wambersie A. Chromosome aberrations induced in patients treated with telecobalt therapy for mammary carcinoma. *Radiat Res.* 1981; 86: 171-177. DOI:10.2307/3575608.
9. Matsubara S, Horiuchi J, Okuyama T, Takeda M, Shibuya H, Suzuki S, *et al.* Chromosome aberrations in the peripheral lymphocytes induced by brachytherapy and external cobalt teletherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1985; 11: 1085-1094. DOI: 10.1016/0360-3016(85)90054-9.
10. Martin RH, Rademaker A, Hildebrand K, Barnes M, Arthur K, Ringrose T, *et al.* A comparison of chromosomal aberrations induced by in vivo radiotherapy in human sperm and lymphocytes. *Mutat Res Lett.* 1989; 226: 21-30. DOI: 10.1016/0165-7992(89)90088-2.
11. Rigaud O, Guedeney G, Duranton I, Leroy A, Doloy MT, Magdelenat H. Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on the circulating lymphocytes of breast cancer patients. I. Chromosome aberrations induced in vivo. *Mutat Res.* 1990; 242: 17-23. DOI: 10.1016/0165-1218(90)90095-j.
12. Tawn E.J, Whitehouse CA, Martin FA. Sequential chromosome aberration analysis following radiotherapy - no evidence for enhanced genomic instability. *Mutat Res.* 2000; 465: 45-51. DOI: 10.1016/s1383-5718(99)00210-7.
13. Cao J, Liu Y, Sun H, Cheng G, Pang X, Zhou Z. Chromosomal aberrations, DNA strand breaks and gene mutations in nasopharyngeal cancer patients undergoing radiation therapy. *Mutat Res.* 2002; 504: 85-90. DOI: 10.1016/s0027-5107(02)00082-9.
14. Chebotarev AN, Celezneva TG, Blastonova VI. Modificaczi medito acraskestrinskichromatid. *Bull Exp Biol Med.* 1978; 2: 242-243.
15. Ainsbury EA, Bakhanova E, Barquinero JF, Brai M, Chumak V, Correcher V, *et al.* Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures. *Radiat Prot Dosim.* 2019; 147: 573-592. DOI: 10.1093/rpd/ncq499.
16. Ramesh KH, Bhargava MK. Cytogenetic damage in peripheral blood lymphocytes of cancer patients prior to radiotherapy. *Cancer Genet Cytogenet.* 1992; 60: 86-88. DOI: 10.1016/0165-4608(92)90239-5
17. Venkatachalam P, Paul SF, Mohankumar MN, Prabhu BK, Gajendiran N, Kathiresan A, *et al.* (1999). Higher frequency of dicentrics and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. *Mutat Res.* 1999; 425: 1-8. DOI: 10.1016/s0027-5107(98)00238-3.
18. Gil OM, Oliveira NG, Rodrigues AS, Laires A, Ferreira TC, Limbert E, *et al.* No evidence of increased chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes from nonfamilial thyroid cancer patients prior to radiotherapy. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000; 123: 55-60. DOI: 10.1016/s0165-4608(00)00305-8.

19. Jones LA, Scott D, Cowan R, Roberts SA. Abnormal radiosensitivity of lymphocytes from breast cancer patients with excessive normal tissue damage after radiotherapy: chromosome aberrations after low dose-rate irradiation. *Int J Radiat Biol.* 1995; 67: 519-528. DOI: 10.1080/09553009514550631.
20. Hille A, Hofman-Hüther H, Kühnle E, Wilken B, Rave-Fränk M, Schmidberger H, *et al.* Spontaneous and radiation-induced chromosomal instability and persistence of chromosome aberrations after radiotherapy in lymphocytes from prostate cancer patients. *Radiat Environ Biophys.* 2009;49: 27-37. DOI:10.1007/s00411-009-0244-x
21. Castro-Volio I. Indicadores citogenéticos para la identificación de exposición a radiación ionizante en humanos. *Acta méd. costarric.* 2013;55:110-117. DOI: 10.51481/amc.v55i3.797
22. Roch-Lefèvre S, Pouzoulet F, Giraudet AL, Voisin P, Vaurijoux A, Gruel G, *et al.* Cytogenetic assessment of heterogeneous radiation doses in cancer patients treated with fractionated radiotherapy. *Br J Radiol Suppl.* 2010; 83: 759-766. DOI:10.1259/bjr/210225597.
23. Ali AK, Al-Amili WA, Abdul-Kareem RA, Muttar AJ, Shatha KK, Adil HE. Chromosomal aberrations and gene expression study in breast cancer patients undergoing radiotherapy. *Iraqi J Biotechnol.* 2019; 18: 277-288.
24. Maser R, DePhino R. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science.* 2002; 297: 565-569. DOI: 10.1126/science.297.5581.565
25. Tinwell H, Ashby J. Genetic toxicity and potential carcinogenicity of taxol. *J Carcinog.* 1994, 15:1499-1501. DOI: 10.1093/carcin/15.8.1499
26. Danesi CC, Bellagamba BC, Dihl RR, de Andrade HHR, Cunha KS, Spanó MA, *et al.* Mutagenic evaluation of combined paclitaxel and cisplatin treatment in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* 2010; 696: 139-143. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2010.01.002
27. Alidema F, Alidema M. Effects of chemotherapy and value of microscopic changes in lymphocytes of circulating blood on patients with oral cancer treated with chemotherapy; 2015; Lipjan, Kosovo. Kosovo: UBT. c2020. DOI:10.33107/ubt-ic.2020.411.
28. Gentile N, Bernardi N, Bosch B, Mañas F, Aiassa D. Estudios de genotoxicidad en trabajadores rurales y familias. *Rev Cubana Investig Bioméd.* 2016; 35: 228-239.
29. Cuenca P, Ramírez V. Aberraciones cromosómicas en trabajadoras expuestas a plaguicidas. *Rev Biol Trop.* 2004 Sep; 52: 623-628.
30. Rondón M, Caicedo J, Robledo JF. Determinación de anomalías cromosómicas y secuencias de ADN amplificadas en cáncer de mama. *Rev Cienc Salu.* 2006; 4: 7-22.
31. Bilban-Jakopin C, Bilban M. Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on circulating lymphocytes in patients with Hodgkin's disease. *Mutat Res.* 2001; 497: 81-88. DOI: 10.1016/s1383-5718(01)00237-6.
32. Morales-Alvarado J, Murga-Valdez M, Moreno-Luján J, López-Deza E, Gutiérrez-Bustamante J, Sánchez-Reyna V. Efecto genotóxico de la glibenclamida, metformina y terapia combinada en línea celular de ovario de hámster. *CIMEL.* 2007; 12: 47-51.
33. Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett, TR, Colston KW. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer.* 2000; 82: 1459. DOI: 10.1054/bjoc.1999.1131
34. Pankaj G, Bhumika D. Frecuencia of satellite associations of acrocentric chromosomes in oral squamous cell carcinoma patients after 5-FU and cisplatin treatment, *Internal J Mol Med Sci.* 2016 Jun 11; 6:1-5.
35. Aydemir N, Bilaloğlu R. Genotoxicity of two anticancer drugs, gemcitabine and topotecan, in mouse bone marrow in vivo. *Mutat Res.* 2003; 537: 43-51. DOI: 10.1016/s1383-5718(03)00049-4.
36. Dumanski JP, Lambert JC, Rasi C, Giedraitis V, Davies H, Grenier-Boley B. *et al.* Mosaic loss of chromosome Y in blood is associated with Alzheimer disease. *Am J Hum Genet.* 2016; 98: 1208-1219. DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.05.014
37. Guo X, Dai X, Zhou T, Wang H, Ni J, Xue J, *et al.* Mosaic loss of human Y chromosome: what, how and why. *Hum Genet.* 2020; 139: 421-446. DOI: 10.1007/s00439-020-02114-w