

ARN PI-27/98



AR9900027

# Indicadores bioquímicos y hematológicos en un modelo de irradiación corporal total

Dubner, D.; Gisone, P.; Pérez, M. del R.; Barboza, M.; Luchetta, P.; Longoni, H.; Sorrentino, M. y Robinson, A.

autoridad regulatoria nuclear

# INDICADORES BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS EN UN MODELO DE IRRADIACIÓN CORPORAL TOTAL<sup>1</sup>

Dubner, D.; Gisone, P. y Pérez, M del R.  
Autoridad Regulatoria Nuclear

Barboza, M.  
Hospital de Clínicas José de San Martín

Luchetta, P.; Longoni, H.; Sorrentino, M. y Robinson, A.  
Hospital Naval Pedro Mallo

Argentina

## RESUMEN

Se presentan los resultados de un estudio multiparamétrico realizado en pacientes sometidos a irradiación corporal total (ICT) a fin de evaluar la aplicabilidad de ciertos indicadores bioquímicos y hematológicos en personas accidentalmente sobreexpuestas a radiaciones ionizantes.

El trabajo se realizó en pacientes incluidos en un protocolo de irradiación terapéutica (12 Gy / 4 días) previo a un trasplante de médula ósea (TMO). Se tomaron muestras secuenciales de sangre periférica hasta el alta del paciente. Se evaluaron:

a) *Stress oxidativo*: actividad intraeritrocitaria de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), lipoperoxidos (TBARS) y capacidad antioxidante total del plasma (TRAP).

b) *Indicadores hematológicos*: análisis de reticulocitos por citometría de flujo y determinación del índice de madurez reticulocitaria (IMR). Abundancia relativa de subpoblaciones linfocitarias y estudio de la actividad funcional citotóxica. Se correlacionaron los resultados obtenidos con la evolución clínica de los pacientes.

No se observaron variaciones significativas en la actividad SOD y CAT. Luego de un incremento inicial, el nivel de TBARS descendió en los pacientes con evolución favorable. Los valores de TRAP disminuyeron durante el condicionamiento con recuperación posterior. Los reticulocitos disminuyeron precozmente. La reaparición de formas inmaduras (corrimiento del IMR) resultó el indicador más temprano de recuperación medular. Durante el condicionamiento radiante, todas las subpoblaciones de linfocitos mostraron una caída en los valores absolutos, particularmente los linfocitos B. Un subtipo de linfocitos NK mostraron una relativa radiorresistencia. Se observó una disminución de la actividad citotóxica .

Se discute la aplicabilidad de estos indicadores en el marco de una irradiación accidental.

## INTRODUCCIÓN

Frente a una situación accidental en la que se presume la existencia de individuos sobreexpuestos a radiaciones ionizantes, la estimación temprana de la dosis absorbida resulta indispensable para la toma de decisiones. Junto a la dosimetría física y la evaluación clínica, los indicadores biológicos constituyen herramientas decisivas para el diagnóstico y pronóstico de pacientes sobreexpuestos. Contribuyen asimismo al diseño de una estrategia terapéutica adecuada y al seguimiento evolutivo de las víctimas.

---

<sup>1</sup> Este trabajo ha sido presentado al 4<sup>to</sup> Congreso Regional en Seguridad Radiológica y Nuclear a celebrarse en La Habana, Cuba, entre el 19 y 23 de octubre de 1998.

La irradiación aguda global es responsable de un síndrome clínico de severidad creciente según las dosis: el síndrome agudo de radiación (SAR), cuyo pronóstico vital está directamente vinculado a la afectación del sistema hematopoyético. La disponibilidad de indicadores hematológicos que permitan determinar su grado de compromiso así como evaluar la cinética de recuperación de la función medular resulta de gran valor.

Por otra parte, la producción de especies activas del oxígeno se postula como el principal mecanismo indirecto de daño radioinducido en los sistemas biológicos. La pérdida del delicado equilibrio entre la generación de radicales libres y la capacidad funcional de los sistemas de defensa antioxidante constituye el mecanismo subyacente de la injuria radioinducida. Los indicadores de stress oxidativo podrían así contribuir a la evaluación y seguimiento de pacientes irradiados.

Considerando que las irradiaciones terapéuticas pueden brindar un modelo válido de irradiación accidental en humanos se estudió el comportamiento de ciertos parámetros hematológicos e indicadores de stress oxidativo en pacientes sometidos a irradiación corporal total (ICT) como parte del condicionamiento previo a un trasplante de médula ósea.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El trabajo se realizó en 20 pacientes (sexo femenino: 8, sexo masculino: 12) de 4 a 54 años (edad media: 30,4 años). El esquema de condicionamiento incluyó quimioterapia seguida de radioterapia. El protocolo de irradiación consistió en una dosis total de 12 Gy administrada en 4 días (3 Gy por día entre los días -4 y -1), con una fuente de cobalto 60, tasa de dosis 0,04 Gy/minuto, distancia fuente-piel 290 cm. Se realizaron dos aplicaciones diarias de 1,5 Gy cada una (anteroposterior y posteroanterior). A partir de los 8 Gy se protegieron los campos pulmonares mediante blindajes. La infusión de médula ósea se llevó a cabo en el día 0. El TMO fue de tipo alogénico (donante histoiéntico) en 15 pacientes, autólogo (stem cells de sangre periférica) en 4 pacientes y singéico (donante gemelo univitelino) en un paciente. En la tabla I se presentan los datos de los pacientes incluidos en el estudio, incluyendo la patología correspondiente que motivó el TMO.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica anticoagulada con EDTA, diariamente durante el tratamiento condicionante y tres veces por semana a partir del TMO hasta el alta del paciente.

Se evaluaron los siguientes parámetros hematológicos:

- a) Análisis de reticulocitos por citometría de flujo y determinación del índice de madurez reticulocitaria: las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (FACSTAR PLUS®) previa tinción con naranja de thiazol (RETIC COUNT®, BECTON DICKINSON). El porcentaje de reticulocitos y la intensidad media de fluorescencia se calculó mediante el programa Lysis I. Se consideró la intensidad de fluorescencia y se dividió a la población de reticulocitos en regiones de baja, media y alta fluorescencia. Se determinó un índice de madurez reticulocitaria (IMR) a partir de la fracción de reticulocitos con alta fluorescencia (RAF), que representa la subpoblación más inmadura. El IMR se definió así como el porcentaje de RAF, sobre la población total [1]. Se realizaron hemogramas periódicos. La reactivación medular post-TMO ("engraftment") fue definida como el primer día en que se constató un incremento sostenido por encima de 500 neutrófilos/ $\mu$ l (recuperación mieloide), 20 000 plaquetas/ $\mu$ l (recuperación trombopoyética) y/o un desplazamiento del IMR mayor del 20% [2].
- b) Abundancia relativa de subpoblaciones linfocitarias: se aislaron células mononucleares de sangre periférica por centrifugación en gradiente de Ficoll. La suspensión celular obtenida se incubó con anticuerpos monoclonales conjugados con colorantes fluorescentes, específicos para los siguientes clusters de diferenciación: CD 45 (panleucocitario), CD14 (monocitos), CD3 (linfocitos T), CD4 (linfocitos T inductores) CD8 (linfocitos T supresores), CD19 (linfocitos B) y CD 56 /CD16 (linfocitos NK). Se realizó el análisis de la abundancia relativa de cada subpoblación por citometría de flujo [3].
- c) Estudio de la actividad funcional citotóxica de linfocitos "natural killer" (NK): se incubaron durante 4 horas las suspensiones de células mononucleares de sangre periférica (efecto-

ras) con células de la línea K562 marcadas con cromo 51 (blanco) en una relación efector/blanco de 40:1 y 25:1. Se calculó el porcentaje de citotoxicidad de acuerdo a [4].

Como indicadores de stress oxidativo se midieron:

- a) Actividad intraeritrocitaria de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) por espectrofotometría [5].
- b) Lipoperóxidos plasmáticos en términos de sustancia reactantes al ácido tiobarbitúrico (TBARS).
- c) Capacidad antioxidante total del plasma (Trapping) [6].

Los valores normales de referencia fueron determinados en poblaciones testigos.

Se consideró evolución favorable la recuperación medular dentro de los 21 días postransplante.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante los tests de Wilcoxon y Anova de una vía.

**Tabla I: Pacientes incluidos en el estudio**

Paciente	Edad	Sexo	Diagnóstico	Tipo de TMO
1	21	Masculino	Leucemia mieloide aguda	Alogénico
2	25	Masculino	Leucemia mieloide aguda	Alogénico
3	28	Femenino	Leucemia mieloide crónica	Alogénico
4	42	Femenino	Leucemia mieloide crónica	Alogénico
5	4	Masculino	Wiscot Aldrich	Alogénico
6	35	Femenino	Leucemia mieloide crónica	Autólogo
7	38	Masculino	Leucemia mieloide aguda	Autólogo
8	44	Masculino	Linfoma no-Hodgkin	Singeneico
9	54	Femenino	Linfoma no-Hodgkin	Autólogo
10	6	Masculino	Talasemia Beta	Alogénico
11	34	Masculino	Leucemia mieloide crónica	Alogénico
12	46	Femenino	Leucemia mieloide crónica	Alogénico
13	21	Masculino	Leucemia mieloide aguda	Autólogo
14	36	Femenino	Leucemia mieloide crónica	Alogénico
15	22	Femenino	Leucemia mieloide aguda	Alogénico
16	35	Femenino	Leucemia mieloide crónica	Alogénico
17	43	Masculino	Mieloma múltiple	Alogénico
18	14	Masculino	Leucemia aguda linfoblástica	Alogénico
19	38	Masculino	Leucemia mieloide aguda	Alogénico
20	22	Masculino	Leucemia mieloide aguda	Autólogo

## RESULTADOS

En todos los pacientes el IMR disminuyó más rápidamente que el número total de reticulocitos y alcanzó valores de 0 en la mayoría de ellos. Después del período aplásico, el corrimiento del IMR precedió en varios días al incremento en el número de reticulocitos (figura 1), resultando el indicador más temprano de recuperación medular ( $16,5 \pm 3,2$  días) respecto de los neutrófilos ( $19,8 \pm 4,6$  días) y las plaquetas ( $26,5 \pm 7,8$  días).

Todas las subpoblaciones de linfocitos mostraron una caída en los valores absolutos 24 horas después de los primeros 3 Gy, siendo los linfocitos B los que mostraron mayor radiosensibilidad (11,4% del valor basal). Los linfocitos T descendieron al 45% de su valor basal sin mostrar diferencias significativas en la respuesta de los subtipos inductor y supresor. Los linfocitos NK descendieron al 52% del valor basal, con un descenso más pronunciado del subtipo CD16 (-) (al 34% del valor basal) respecto del subtipo CD 16 (+) (al 71,4% del valor basal). La actividad citotóxica basal de  $16,23 \pm 4,6\%$  descendió a  $5,93 \pm 3,2\%$  veinticuatro horas después de los primeros 3 Gy.

No se observaron variaciones estadísticamente significativas en la actividad SOD y CAT intraeritrocitaria en el período estudiado.

Con respecto al comportamiento de Trapping se pudo observar que en el grupo de pacientes con evolución favorable los valores del mismo se encontraron por debajo del valor normal, alcanzado en la etapa final de la recuperación.

En el grupo de pacientes con evolución desfavorable, paradójicamente, se observó una tendencia a una mayor capacidad antioxidante total en plasma. Pero el análisis de los datos bioquímicos convencionales demostró que los mayores valores observados se corresponden con concentraciones plasmáticas elevadas de ácido úrico y/o bilirrubina.

Los valores de TBARS de todos los pacientes estudiados se mantuvieron por encima de los valores normales durante el período de seguimiento completo. En el grupo de pacientes con evolución desfavorable se observó una tendencia a mayores valores de lipoperoxidación durante el condicionamiento y el incremento fue significativo desde la primera semana hasta la tercera semana postransplante con relación al grupo de pacientes con evolución favorable.

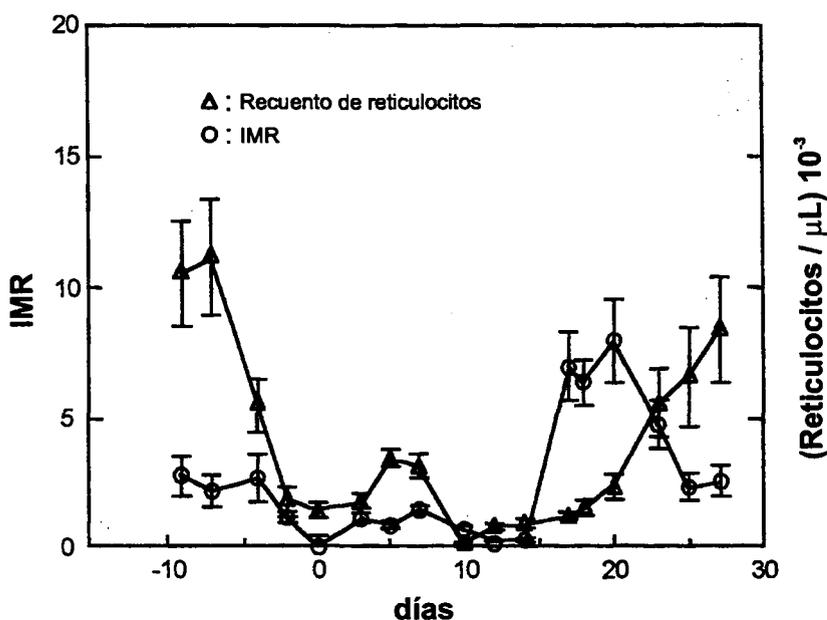
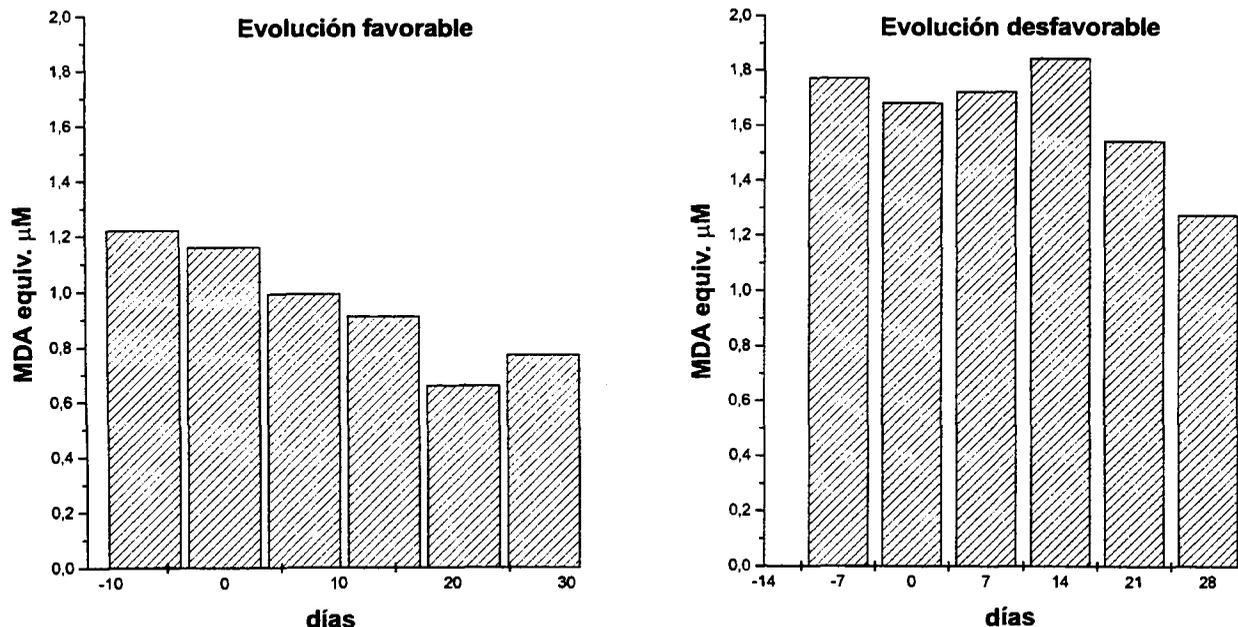


Figura 1: Comportamiento del número de reticulocitos y del índice de madurez reticulocitaria (IMR) durante el período estudiado. La infusión medular tuvo lugar en el día 0.



**Figura 2: Concentración plasmática de TBARS, expresada como equivalentes de malondialdehído (MDA), de acuerdo a la evolución clínica de los pacientes.**

## DISCUSIÓN

Estos resultados permiten inferir que el recuento diferencial de reticulocitos por citometría de flujo con determinación de un IMR constituye un indicador precoz de daño hematopoyético capaz de predecir la recuperación funcional post-aplasia medular radioinducida, precediendo en varios días a los parámetros convencionalmente utilizados.

El análisis de la abundancia relativa de subpoblaciones linfocitarias puede resultar una herramienta útil para el diagnóstico y seguimiento evolutivo de individuos sobreexpostos. La facilidad y rapidez en la obtención de los resultados (pocas horas) permitiría una evaluación temprana del alcance de la afectación medular de estos pacientes. El hallazgo de una subpoblación de NK de relativa radiorresistencia sugiere que este subtipo de linfocitos podría jugar un rol en el desarrollo de los fenómenos de rechazo observados en los TMO alogénicos en las aplasias medulares radioinducidas.

El nivel de lipoperóxidos plasmáticos se mostró como un buen indicador pronóstico vinculado a la evolución clínica global del paciente.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Davis, B.H. et al. "Proposal for Standardization of Flow Cytometric Reticulocyte Maturity Index Measurements", *Cytometry* 14:318-326 (1993).
- [2] Dalal, B., Stockford G.R., Naiman S.C., Spinelli J. and Phillips G.L. "Criteria for Marrow EnGraftment: Comparison of Reticulocyte Maturity Index with Conventional Parameters", *Bone Marrow Transplantation* 17:91-92 (1996)
- [3] Rowley, D. et al. "Flow Cytometric Analysis of Lymphocyte Surface Markers Following a 1 Gy dose of Gamma Radiation", *Aviation, Space and Environmental Medicine* 64:528-533 (1993).
- [4] Vulcano, M. et al. "Inhibition of Normal Natural Killer Cytotoxicity by Sera from Hemophilic Patients", *Immunology Letters*, 36: 153-160 (1993).

- [5] Dubner, D., Pérez, M. and Gisone, P. "Blood Oxidative Stress Parameters and their Correlation with Indicators of Bone Marrow Recovery After Total Body Irradiation" in: *Natural Antioxidants and Good Quality in Atherosclerosis and Cancer Prevention*, p.46, edited by Kumpulainen, J. and Salonen, J., The Royal Society of Chemistry (1996).
- [6] Miller, N. and Rice-Evans, C. "Spectrophotometric Determination of Antioxidant Activity" *Redox Report* 2:161-171 (1996).