

Estudio de radiosensibilidad en pacientes pediátricos con inmunodeficiencia primaria

Fernández Rearte, J.; Deminge, M.; Radl, A.;
Cabitto, M.; Carabajal, P.; Gómez Raccio, A.;
Di Giovanni, D.; Rotondo, S. y Di Giorgio, M.

Presentado en: XVII Congreso Latinoamericano de Genética,
XLVII Congreso Argentino de Genética,
LII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile,
VI Congreso de la Sociedad Uruguaya de Genética,
V Congreso Latinoamericano de Genética Humana y
V Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución .
Mendoza, Argentina, 6 al 9 de octubre de 2019



INTRODUCCIÓN

La radiosensibilidad individual (RS) es una característica inherente al sujeto, asociada con una reacción aumentada a las radiaciones ionizantes. Se sugiere que la incidencia y severidad de estas reacciones está principalmente influenciada por la susceptibilidad genética a la radiación, aunque diversos factores relacionados con el paciente como estados de alteración de la microvasculatura y alteraciones de la respuesta inmune pueden modificar la respuesta tisular a las radiaciones ionizantes (RI).

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son enfermedades genéticas con defectos en el desarrollo, función y/o regulación de uno o más componentes del sistema inmune, que se manifiestan con infecciones, autoinmunidad, alergia, linfoproliferación, inflamación y malignidad. Un grupo de estas IDP se caracteriza por presentar defectos en la reparación del ADN con aumentada RS y para su tratamiento, requieren frecuentes estudios de imágenes y drogas que pueden impactar en la integridad del ADN.

La utilidad de tests predictivos de RS proporcionarían una herramienta adicional para la protección radiológica del paciente, personalizando el tratamiento médico.

OBJETIVO

Evaluar la aplicabilidad de los ensayos de micronúcleos (CBMN) y el ensayo de Cometa (SCGE) como ensayos predictivos de RS en pacientes pediátricos con sospecha de IDP

MATERIALES Y MÉTODOS

Se describen las evaluaciones realizadas mediante el ensayo CBMN y el ensayo de Cometa Alcalino (SCGE) de 2 casos clínicos de pacientes pediátricos con diagnóstico de IDP combinada

Paciente 1

Enfermedad inflamatoria intestinal, infección por citomegalovirus, hipogammaglobulinemia, linfopenia CD4, proliferaciones celulares alteradas. Sin variantes patogénicas en panel de biología molecular para IDP.

Paciente 2

Infecciones respiratorias recurrentes, Síndrome de Hiper IgM y posterior diagnóstico de Síndrome de PI3Kδ activado

Reposo 2 hs

CBMN

Cultivo de linfocitos + Cyt B
- Tinción: Giemsa 5%
Lectura M.O.

Frecuencia de MN en 1000 células binucleadas

Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada
0 Gy	0 Gy
2 Gy	2 Gy

Curva de Calibración con I.C. 95% Individuos sanos

Test de χ^2

$$\chi^2 = \sum \frac{(fo - fe)^2}{fe} > 3,84 \text{ (GL=1; } p < 0,05)$$

Hipersensibilidad a las R.I.

Cometa Alcalino

Electroforesis en gel de células individuales
- Tinción: Bromuro de etidio 1X

Visualización: Microscopio epifluorescencia (20x)
Software Comet IV

Head Length	Tail Length	Head %	Tail %	Tail Moment	Wahlb	Total Area	Total Len	Midn
63.00	167.00	22.22	72.78	135.50	40.80	93260	12271	67.83

Parámetro de cuantificación del daño en el ADN

$$OTM(t) = TM_0 \cdot e^{-\frac{(t-T_{1/2})}{T_{1/2}}} + TM_R$$

Cinética de Capacidad de reparación

Parámetro de la RS clínica e *in vitro*

En estudios previos en nuestro laboratorio se identificaron 3 subpoblaciones de individuos respecto a su RS clínica e *in vitro*, caracterizadas por las medias de sus T_{1/2}

Control	Pacientes con respuesta promedio	Pacientes con respuesta aumentada
2,6 ± 0,3	4,7 ± 2,9	24,9 ± 10,4

RESULTADOS

Paciente 1

Frecuencia Observada Control	Frecuencia Observada 2Gy in vitro	Frecuencia Esperada 0Gy	Frecuencia Esperada 2Gy	Si fo > fe 0 Gy	Test de χ^2 0 Gy	Test de χ^2 2Gy
0,005	0,201	0,017	0,183	0	0,00	1,79

Tabla 1. Los datos obtenidos de la aplicación del Test de MN fueron analizados comparando las frecuencias esperadas de MN (curva de calibración de individuos sanos) con los valores observados después de la irradiación *in vitro*, aplicando el test de χ^2 . El valor 1,79 indica diferencias no significativas entre las frecuencias de MN esperadas y observadas

Radiosensibilidad normal a las R.I.

Paciente 2

Cometa Alcalino

Tail Moment (alfa) vs Time [NORMALIZADO]

TM ₀	TM _R	λ	T 1/2	R ²
0,204	0,795	0,055	12,55	0,995

Tabla 2. Perfil de reparación normalizado de la muestra evaluada

Tiempo medio de reparación T _{1/2} [min]		Daño residual TM _R
Controles sanos (2,6±0,3)	Pacientes con respuesta promedio (4,7±2,9)	Pacientes con respuesta aumentada (24,9±10,4)
		12,55±1,42
		0,20±0,02

Tabla 3. Comparación del T_{1/2} obtenido para la muestra evaluada con las medias de los T_{1/2} de tres subpoblaciones, previamente caracterizadas en el laboratorio. El parámetro TM_R indica que aproximadamente el 20% de los linfocitos no reparan el daño inducido *in vitro*.

Si bien los valores obtenidos mediante el ensayo de Cometa se encuentran en el límite inferior de los valores considerados en el intervalo de confianza de los pacientes con respuesta aumentada, los resultados evidencian hipersensibilidad del paciente a las R.I. Dicho resultado es posteriormente confirmado mediante la técnica de CBMN:

Paciente 2

Frecuencia Observada Control	Frecuencia Observada 2Gy in vitro	Frecuencia Esperada 0Gy	Frecuencia Esperada 2Gy	Si fo > fe 0 Gy	Test de χ^2 0 Gy	Test de χ^2 2Gy
0,023	0,299	0,017	0,183	1	1,92	73,43

Hipersensibilidad a las R.I.

CONCLUSIÓN

La caracterización de la reparación del ADN en los linfocitos mediante la aplicación del test de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) y el ensayo de cometa alcalino (SCGE) podrían ser aproximaciones apropiadas para evaluar la radiosensibilidad *in vitro*.

Estos resultados permitirían determinar la aplicabilidad de los ensayos predictivos como una herramienta para la evaluación de pacientes con sospecha de IDP que requieran procedimientos radiantes, drogas radiomiméticas o trasplante de precursores hematopoyéticos para su tratamiento