

# Diseño óptimo de experimentos aplicado al establecimiento de programas de bioensayos

Guillermo Sánchez (gsl@fab.enusa.es). ENUSA Industrias Avanzadas. S.A.  
Juan M. Rodríguez. Dpto. Estadística de la Universidad de Salamanca.

**Abstract.**- *Bioassays can be used to estimate the intake for the case of accidental intake. The bioassay measures can be used to estimate by fitting the parameters unknown. In this paper optimal designs for the estimation of the unknown parameters are developed.. The method described applies Optimal Design to find the best moments where the bioassay measurements should be taken. The method has been implemented in a computer program.*

**Sinopsis.**- *Para estimar incorporaciones desconocidas de sustancias radiactivas en el organismo, especialmente en condiciones de accidente, puede ser necesaria la realización de bioensayos (ej.: medidas con un contador de radiactividad pulmonar o corporal, excreción urinaria y fecal). La cantidad incorporada se calcula por ajuste estadístico de los resultados de los bioensayos a un modelo matemático que representa la biocinética de la sustancia incorporada. En estos modelos se suele suponer que el único parámetro desconocido es la incorporación,  $I$ , asumiéndose como conocidos otros parámetros (ej.: en el caso de una inhalación accidental, se supone conocido el diámetro (AMAD) de los aerosoles, la fracción  $f_I$  que se trasfiere desde el sistema gastrointestinal a la sangre). Esta simplificación implica añadir bastantes incertidumbres en la estimación de la dosis. Hemos desarrollado un método matemático, que aplica técnicas de diseño óptimo de experimentos (DOE) a modelos no lineales, donde además de  $I$  se puede asumir como desconocidos otros parámetros como es el AMAD o  $f_I$ . El método es aplicable para establecer los momentos más adecuados en los que realizar las medidas de los bioensayos minimizando la incertidumbre de las estimaciones. Hemos aplicado el método a las condiciones que se dan en la fábrica de Juzbado, donde se procesa uranio que puede dar lugar a aerosoles de óxido de uranio. Para facilitar su aplicación se ha desarrollado un programa que se puede ejecutar en: <http://www3.enusa.es/webMathematica/Public/biokmod.html>.*

## Introducción

Los modelos biocinéticos recogidos en la ICRP <sup>(1)</sup> matemáticamente se pueden modelar por sistemas de ecuaciones diferenciales de primer orden con coeficientes constantes.

Aplicando el modelo correspondiente a un determinado isótopo y vía de incorporación (inhalación, ingestión o inyección) puede predecirse para un bioensayo  $m$  (retención pulmonar, tasa de excreción urinaria o fecal, etc.) la cantidad que teóricamente se espera medir  $R_m(t)$  en función de la actividad incorporada  $I$ . Esto es

$$R_m(t) = I r_m(t, k_1, \dots, k_n) \quad (1)$$

Donde :

$r_m(t, k_1, \dots, k_n)$  es usualmente llamada función de retención que aplica a una incorporación puntual unidad en  $t = 0$ . Los parámetros  $k_1, \dots, k_n$  son los propios del modelo (por ejemplo: constantes de transferencia) y con otros están asociados con características específicas de la sustancia incorporada (tipo de metabolización, AMAD, etc),

Consideremos el caso donde, además de  $I$ , uno o mas parámetros,  $\beta = \{\beta_1, \dots, \beta_q\}$ , del modelo sean desconocidos (ej.: AMAD,  $f_I$ ). Queremos determinar estos parámetros  $I$  y  $\beta$  realizando, para el ensayo  $m$ ,  $X_i$  determinaciones, con sus incertidumbres asociadas  $u_i$ , en diferentes momentos  $t_i$ . Usando los valores  $\{X_i, t_i\}$  obtendremos  $I$  y  $\beta$  por ajuste con el modelo  $R_m(I, \beta, t)$ .

Ello puede realizarse utilizando métodos de ajustes no lineal como los incluidos en BLOKMOD<sup>(2,3)</sup>.

El objetivo que nos planteamos es calcular los momentos  $t_i$  en los que realizar estas determinaciones tal que la incertidumbre asociadas a  $I$  y  $\beta$  sean mínimas. Para ello vamos a utilizar una técnica matemática conocida como diseño óptimo de experimentos.

El método ya ha sido desarrollado por los autores. En esta ponencia mostraremos como puede aplicarse de forma sencilla para lo que incluiremos ejemplos que consideramos pueden representar situaciones realistas. A partir de ellos pretendemos dar algunas indicaciones prácticas.

## Descripción del método

Para calcular el diseño óptimo aplicable en la determinación de los momentos  $t_i$  mas adecuados para realizar las determinaciones usaremos el método conocido como diseño D-optimal<sup>(4)</sup>.

El método requiere conocer la expresión analítica  $R_m(I, \beta, t)$  donde  $I$  es la cantidad incorporada (desconocida), y  $\beta$  representa el parámetros o parámetros desconocidos. La expresión  $R_m(I, \beta, t)$  puede calcularse para muchos de los modelos de la ICRP, en concreto todos aquellos que no presentan recirculación y algunos casos particulares con recirculación. Por ejemplo: el modelo del pulmonar es completamente parametrizable<sup>(5)</sup>.

La función de retención  $R_m(I, \beta, t)$  para caso de incorporación puntual única en  $t = 0$  usualmente la expresamos como<sup>(6)</sup>

$$R_m(I, \beta, t) = I \sum_{r=1}^q F_r(\beta) e^{-G_r(\beta)t} \quad (2)$$

siendo  $F_r(\beta)$  y  $G_r(\beta)$  expresiones obtenidas resolviendo el modelo para cada caso específico

Ahora vamos a calcular el diseño aplicando el método D-optimal<sup>(4,6,7)</sup>.

Para su aplicación establecemos varias restricciones: i) Una vez elegido el tipo de bioensayo asumiremos que todas las medias se realizan exclusivamente con este tipo de bioensayo (ej.: si se opta por hacer las determinaciones con un contador de radiactividad pulmonar o CRC, todas serán con el CRC), ii) Las medidas se realizaran en momentos diferentes, y la primera determinación se tomará en  $t_0 > 0$ , iii) Se fijan el número de determinaciones a realizar.

Partimos de  $R_m(I, \beta, t)$  que la rescribimos como  $\eta(t; s)$ , donde  $s = \{s_1, \dots, s_p\}$ , es el vector de parámetros desconocidos, esto es  $s = \{I, \beta_1, \dots, \beta_q\}$ .

Calculamos la matriz de información de Fisher<sup>(4)</sup>,  $\mathbf{M}$ , para el diseño específico  $\xi = \{t_1, \dots, t_n\}$  ( $t_i$  es el tiempo en el que se realizará la  $i$ -ésima medida).

$$\mathbf{M} = E \left[ \begin{array}{cc} \frac{\partial \log l}{\partial s_i} & \frac{\partial \log l}{\partial s_j} \\ \frac{\partial \log l}{\partial s_j} & \frac{\partial \log l}{\partial s_k} \end{array} \right] \quad (3)$$

siendo  $l$  la función de verisimilitud para la regresión de los residuos.

En el método D-optimal los puntos de muestreo se obtienen maximizando el determinante la matriz  $\mathbf{M}$ , para ello es necesario definir el primer punto de muestreo el número de determinaciones que se desean realizar.

Para calcular el máximo de  $|\mathbf{M}|$  se requiere que  $\eta(t; s)$  sea continuamente diferenciable con respecto a  $s$  y los errores estén normalmente distribuidos, entonces

$$\mathbf{M} = \mathbf{X}^T \Sigma^{-1} \mathbf{X} \quad (4)$$

donde

$\mathbf{X}$  is la matriz  $n \times p$  cuya fila  $i$ -ésima esta dada por

$$\nabla \eta(t_i, s) = \left( \frac{\partial \eta(t_i, s)}{\partial s_1}, \dots, \frac{\partial \eta(t_i, s)}{\partial s_p} \right) \quad (5)$$

$\Sigma$  es la matriz de covarianzas de los residuos.

Puesto que el diseño se realiza para ser aplicado a un trabajador concreto es conveniente considerar que existe una correlación entre las distintas medidas. Una elección frecuente<sup>(8)</sup> es considerar que la matriz de covarianzas es  $\Sigma = \sigma^2 \Gamma$ , donde  $\sigma^2$  es la desviación estandar asociada con el sistema de medida, que se supone similar en todas las medidas, y  $\Gamma=(l_{ij})$  con  $l_{ij}=\exp(-\rho|t_j-t_i|)$ , es decir: la relación entre dos medias disminuye exponencialmente con el tiempo. El parámetro  $\rho$  es característico de cada trabajador, como este es desconocido utilizaremos  $\rho=1$ . En lugar de  $l_{ij}=\exp(-\rho|t_j-t_i|)$ , con  $\rho=1$ , puede utilizarse  $l_{ij}=\exp(-d_i t)$  siendo  $d_i=t_i-t_{i-1}$  la distancia entre dos medidas consecutivas. Hemos encontrado que este procedimiento es más conveniente a la hora de implementar el método en un programa.

El último paso consiste en calcular los valores de  $t_i$  que maximizan  $\det|\mathbf{M}|$

Mostraremos con un ejemplo, paso a paso, el método anterior:

Sea  $R(I, p, t)=I \text{Exp}(-0.02 t + 0.2 p)$  con parámetros desconocidos  $s=\{I, p\}$ .

Sustituimos en (5) y obtenemos que

$$\nabla (R(I, p, t))=\{\partial R/\partial I, \partial R/\partial p\}=\{\text{Exp}(-0.02 t + 0.2 p), 0.2 I \text{Exp}(-0.02 t + 0.2 p)\}.$$

Elegimos el número  $n$  de puntos muestrear. En este ejemplo suponemos  $n=2$ , esto es  $t: \{t_0, t_1\}$ .

Obtenemos  $\mathbf{X}$  calculando  $\nabla (R(I, p, t))$  en los puntos  $\{t_0, t_1\}$ .

Para los mismos puntos calculamos  $\Gamma=(l_{ij})=\{\{1, \text{Exp}(-|t_0-t_1|)\}, \{\text{Exp}(-|t_0-t_1|), 1\}\}$ .

Ya podemos obtener  $\Sigma=\sigma^2 \Gamma$  y de aquí  $\mathbf{M} = \mathbf{X}^T \Sigma^{-1} \mathbf{X}$ .

Finalmente, asignamos un valor a  $t_0$  y calculamos  $\{t_0, t_1\}$ , maximizando el  $\det|\mathbf{M}|$ . Si elegimos  $t_0=0.5$  se obtiene que el mejor momento para tomar la segunda medida es  $t_1=2.4$  (en las mismas unidades temporales que  $t_0$ ).

Utilizando el método previo uno de los autores (Sánchez) ha desarrollado un programa que esta disponible <http://web.usal.es/guillermo>

## Aplicación

Vamos a considerar un caso típico que podría darse en la zona cerámica de la fábrica de Juzbado donde el oxido de uranio enriquecido se procesa en forma de polvo. Normalmente la fracción de aerosoles que se liberan a las áreas de trabajo es muy pequeña, pero vamos a considerar un ejemplo, con datos simulados, de una situación accidental.

**Ejemplo.-** Suponemos que un trabajador en una operación de limpieza de un horno de oxidación no ha utilizado la mascara buconasal preceptiva resultando expuesto a un incorporación desconocida de aerosoles de uranio, de un enriquecimiento del 4.4 %. Para estimar la cantidad incorporada, y con esta la dosis, debemos decidir que tipo de bioensayos realizar y en que momento tomar las medidas.

El tipo de bioensayo que nos puede dar una información más rápida es la medidas con el contador de radiactividad corporal (CRC), aunque podrían tomarse adicionalmente muestras de excretas (urinaria y o fecal).

En el caso de los óxidos de uranio las medidas de excretas se suele realizar por fosforescencia láser. Con esta técnica se mide el contenido del elemento uranio, pero no su composición isotópica, por tanto no permite dilucidar si se trata de uranio natural o enriquecido. Por ello hay que asumir que el uranio detectado procede de lo inhalado, cuyo enriquecimiento sí es conocido. Se plantea el problema de que el uranio se presenta en las excretas de forma natural (consecuencia de la alimentación y otros factores) presentando gran variabilidad entre individuos. Todo ello nos lleva a elegir el CRC como técnica mas adecuada en caso de accidente. Sobre el método de medida (mínima actividad detectable, incertidumbres, etc) nos basamos en IAEA 1996<sup>(9)</sup>.

Nuestro objetivo es I a partir de las medidas  $X_i$  realizadas con el CRC en los instantes  $t_i$ . Con diseño óptimo podemos elegir los instantes  $t_i$  mas apropiados. En principio podemos asumir que todos los parámetros del modelo son conocidos, sin embargo el AMAD de los aerosoles que se produce en el horno de oxidación es desconocido. Según la ICRP 66 en estos casos puede asumirse AMAD 5  $\mu\text{m}$ , sin embargo nosotros optaremos por no asignarle ningún valor y dejarlo como parámetro para ser ajustado a partir de los datos experimentales. Es decir, el modelo puede ser expresado como  $R(I, p, t) = I r(t, p)$  donde  $p$  es el valor del AMAD. El método requiere fijar el momento de la primera medida. Consideramos que esta se toma 12 h (0.5 días) después de la incorporación accidental. Utilizando el modulo de BLOKMOD, que incorpora el procedimiento antes descrito y el modelo pulmonar de la ICRP 66<sup>(10)</sup>, calculamos los mejores momentos para realizar las diferentes número de medidas para. Los valores de  $t_i$  en función del número de medidas que estemos dispuestos a realizar se muestran en la tabla 1.

Optamos por tomar 6 medidas. La razón es que es el diseño que nos permite disponer dos medidas en un periodo corto tras el accidente, por lo que esas dos medidas nos permitirían realizar una primera evaluación, que mas tarde podríamos completar con las 4 siguientes. Los resultados de todas las medidas (simulados) son las siguientes:  $\{t_i \text{ (días)}, X_i \text{ (Bq } ^{235}\text{U)}\}$   $\{\{0.5, 41\}, \{5, 38\}, \{69, 24\}, \{77, 25\}, \{84, 26\}, \{92, 20\}\}$ . Se asume una incertidumbre en la medida, similar para todas, de 2 Bq  $^{235}\text{U}$ . Usando BLOKMOD obtenemos que la incorporación ha sido 969 Bq  $^{235}\text{U}$  y el AMAD estimado de 7.9  $\mu\text{m}$  que es próximo al valor “verdadero” (los datos anteriores fueron obtenidos por simulación asumiendo de 850 Bq y AMAD 7  $\mu\text{m}$  y incluyendo un ruido normal  $N(0,2)$ ). La figura compara los datos medidos con la curva de ajuste. El CRC mide Bq  $^{235}\text{U}$  y nosotros necesitamos estimar U. Podemos hacerlo teniendo en cuenta que se trata de uranio enriquecido al 4.4% 3.5 Bq of  $^{235}\text{U}$  equivalen a 100 BqU. Es decir: El individuo supuestamente ha incorporado  $969 \cdot 100 / 3.5 = 27686$  BqU.

Tabla 1: Momento en días después de la incorporación en el que deberían tomarse las medidas, en función de n (total de medidas a realizar)

$n$	$t_0$	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_4$	$t_5$	$t_6$
2	0.5	69					
3	0.5	65	73				
4	0.5	61	69	77			
5	0.5	58	66	73	81		
6	0.5	5	69	77	84	92	
7	0.5	5	66	74	81	88	95

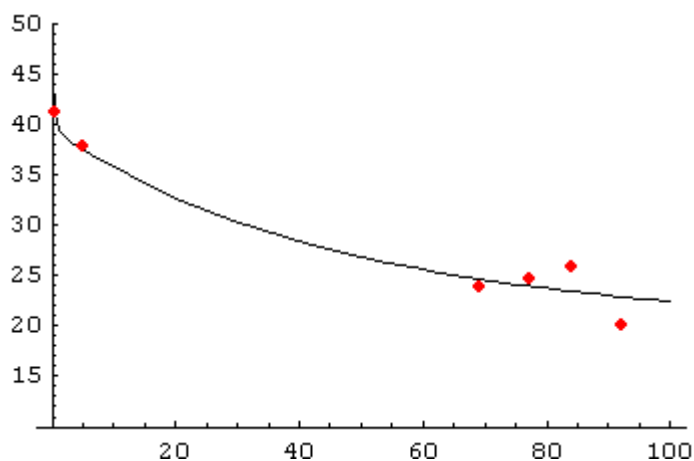


Fig 1.- Curva de ajuste Bq <sup>235</sup>U vs días

## Conclusiones

Una evaluación realizada con la metodología descrita nos ha permitido concluir que en el caso de aerosoles de uranio tipo S, que son los habitualmente utilizados en la fábrica de Juzbado, lo más aconsejable ante una incorporación accidental desconocida es:

Seleccionar el CRC como bioensayo más apropiado para estas situaciones

Realizar la primera medida tan pronto sea posible. Esto es así pues el comportamiento menos lineal de la retención pulmonar se presenta en las primeras horas, permitiendo disminuir la incertidumbre en la estimación del AMAD mientras menor sea el tiempo desde la incorporación al de la medida.

Si la primera medida fuese sustancialmente superior a la actividad mínima detectable del CRC se aconsejaría una segunda medida trascurridos 5 días desde la incorporación inicial. Con los resultados de esas dos primeras medias podrá decidirse si se realizan más. Caso de ser necesarios la siguiente medida debería realizarse en torno a dos meses tras la segunda medida.

El CRC (y cualquier otro bioensayo) sólo sería capaz de detectar con una precisión razonable la incorporación de U, como UO<sub>2</sub>, si la cantidad incorporada es muy elevada.

En el sitio: <http://www3.enusa.es/webMathematica/Public/biokmod.html> se pueden calcular tanto el diseño óptimo como estimar las cantidades incorporadas a partir de bioensayos

## Referencias

1. International Commission on Radiological Protection. ICRP Database of Dose Coefficients: Workers and Members of the Public. Version 2.0.1 (CD-ROM), Oxford: Pergamon Press; (ICRP); 2001.
2. Sánchez G; "Fitting bioassay data and performing uncertainty analysis with BIOKMOD" Health Physics.. 92(1) :64-72. 2007. ISSN/ISBN: 0017-9078
3. Sanchez G., BIOKMOD: A Mathematica toolbox for modeling Biokinetic Systems. Mathematica and Research Vol.10 No.2; 2005
4. López-Fidalgo J, Rodríguez-Díaz J.M., Sánchez G. and Santos-Martín M.T. Optimal Designs for Compartmental Models with Correlated Observations. Journal of Applied Statistics Vol. 32, No. 10, 1075–1088; 2005.
5. Sanchez G, Lopez-Fidalgo J. Mathematical techniques for solving analytically large compartmental systems. Health Phys 85:184-193; 2003.
6. G. Sánchez; J. M. Rodríguez-Díaz . Optimal design and mathematical model applied to establish bioassay programs": Radiation Protection Dosimetry. doi:10.1093/rpd/ncl499. 2007. ISSN/ISBN: ISSN 1742-3406
7. Hill, P. D. H., 1980, D-optimal designs for partially nonlinear regression models. Technometrics 22:275–276.
8. Cressie, N., Statistics for Spatial Data, Wiley, New York 1993
9. International Atomic Energy Agency. Direct Method for Measuring Radionuclides in the Human Body. IAEA Safety Series No. 114. Vienna 1996.
10. International Commission on Radiological Protection. Human respiratory tract model for radiological protection. Oxford: Pergamon Press; ICRP Publication 66; 1994.