

Dosimetría citogenética: Aplicaciones en materia de preparación y respuesta a las emergencias radiológicas



FECHA DE PUBLICACIÓN: OCTUBRE DE 2014



IAEA

Organismo Internacional de Energía Atómica

NORMAS DE SEGURIDAD DEL OIEA Y PUBLICACIONES CONEXAS

NORMAS DE SEGURIDAD DEL OIEA

Con arreglo a lo dispuesto en el artículo III de su Estatuto, el OIEA está autorizado a establecer o adoptar normas de seguridad para proteger la salud y reducir al mínimo el peligro para la vida y la propiedad, y a proveer a la aplicación de esas normas.

Las publicaciones mediante las cuales el OIEA establece las normas figuran en la **Colección de Normas de Seguridad del OIEA**. Esta serie de publicaciones abarca la seguridad nuclear, radiológica, del transporte y de los desechos. Las categorías comprendidas en esta serie son las siguientes: **Nociones fundamentales de seguridad, Requisitos de seguridad y Guías de seguridad**.

Para obtener información sobre el programa de normas de seguridad del OIEA puede consultarse el sitio del OIEA en Internet:

<http://www-ns.iaea.org/standards/>

En este sitio se encuentran los textos en inglés de las normas de seguridad publicadas y de los proyectos de normas. También figuran los textos de las normas de seguridad publicados en árabe, chino, español, francés y ruso, el glosario de seguridad del OIEA y un informe de situación relativo a las normas de seguridad que están en proceso de elaboración. Para más información se ruega ponerse en contacto con el OIEA, P.O. Box 100, 1400 Viena (Austria).

Se invita a los usuarios de las normas de seguridad del OIEA a informar al Organismo sobre su experiencia en la utilización de las normas (por ejemplo, como base de los reglamentos nacionales, para exámenes de la seguridad y para cursos de capacitación), con el fin de garantizar que sigan satisfaciendo las necesidades de los usuarios. La información puede proporcionarse a través del sitio del OIEA en Internet o por correo postal, a la dirección anteriormente señalada, o por correo electrónico, a la dirección Official.Mail@iaea.org.

PUBLICACIONES CONEXAS

Con arreglo a las disposiciones del artículo III y del párrafo C del artículo VIII de su Estatuto, el OIEA facilita y fomenta la aplicación de las normas y el intercambio de información relacionada con las actividades nucleares pacíficas, y sirve de intermediario para ello entre sus Estados Miembros.

Los informes sobre seguridad y protección en las actividades nucleares se publican como **Informes de Seguridad**, que ofrecen ejemplos prácticos y métodos detallados que se pueden utilizar en apoyo de las normas de seguridad.

Otras publicaciones del OIEA relacionadas con la seguridad se publican como **informes sobre evaluación radiológica, informes del INSAG** (Grupo Internacional Asesor en Seguridad Nuclear), **Informes Técnicos**, y **documentos TECDOC**. El OIEA publica asimismo informes sobre accidentes radiológicos, manuales de capacitación y manuales prácticos, así como otras obras especiales relacionadas con la seguridad.

Las publicaciones relacionadas con la seguridad física aparecen en la **Colección de Seguridad Física Nuclear del OIEA**.

La **Colección de Seguridad Física Nuclear del OIEA** comprende publicaciones de carácter informativo destinadas a fomentar y facilitar la investigación, el desarrollo y la aplicación práctica de la energía nuclear con fines pacíficos. Incluye informes y guías sobre la situación y los adelantos de las tecnologías, así como experiencias, buenas prácticas y ejemplos prácticos en relación con la energía nucleoelectrónica, el ciclo del combustible nuclear, la gestión de desechos radiactivos y la clausura.

**DOSIMETRÍA CITOGÉNÉTICA:
APLICACIONES EN MATERIA DE
PREPARACIÓN Y RESPUESTA A LAS
EMERGENCIAS RADIOLÓGICAS**

Los siguientes Estados son Miembros del Organismo Internacional de Energía Atómica:

AFGANISTÁN	FILIPINAS	OMÁN
ALBANIA	FINLANDIA	PAÍSES BAJOS
ALEMANIA	FRANCIA	PAKISTÁN
ANGOLA	GABÓN	PALAU
ARABIA SAUDITA	GEORGIA	PANAMÁ
ARGELIA	GHANA	PAPUA NUEVA GUINEA
ARGENTINA	GRECIA	PARAGUAY
ARMENIA	GUATEMALA	PERÚ
AUSTRALIA	HAÍTÍ	POLONIA
AUSTRIA	HONDURAS	PORTUGAL
AZERBAIYÁN	HUNGRÍA	QATAR
BAHAMAS	INDIA	REINO UNIDO DE
BAHREIN	INDONESIA	GRAN BRETAÑA E
BANGLADESH	IRÁN, REPÚBLICA	IRLANDA DEL NORTE
BELARÚS	ISLÁMICA DEL	REPÚBLICA ÁRABE SIRIA
BÉLGICA	IRAQ	REPÚBLICA
BELICE	IRLANDA	CENTROAFRICANA
BENIN	ISLANDIA	REPÚBLICA CHECA
BOLIVIA	ISLAS MARSHALL	REPÚBLICA DE MOLDOVA
BOSNIA Y HERZEGOVINA	ISRAEL	REPÚBLICA DEMOCRÁTICA
BOTSWANA	ITALIA	DEL CONGO
BRASIL	JAMAICA	REPÚBLICA DEMOCRÁTICA
BRUNEI DARUSSALAM	JAPÓN	POPULAR LAO
BULGARIA	JORDANIA	REPÚBLICA DOMINICANA
BURKINA FASO	KAZAJSTÁN	REPÚBLICA UNIDA
BURUNDI	KENYA	DE TANZANÍA
CAMBOYA	KIRGUISTÁN	RUMANIA
CAMERÚN	KUWAIT	RWANDA
CANADÁ	LESOTHO	SAN MARINO
CHAD	LETONIA	SANTA SEDE
CHILE	LÍBANO	SENEGAL
CHINA	LIBERIA	SERBIA
CHIPRE	LIBIA	SEYCHELLES
COLOMBIA	LIECHTENSTEIN	SIERRA LEONA
CONGO	LITUANIA	SINGAPUR
COREA, REPÚBLICA DE	LUXEMBURGO	SRI LANKA
COSTA RICA	MADAGASCAR	SUDÁFRICA
CÔTE D'IVOIRE	MALASIA	SUDÁN
CROACIA	MALAWI	SUECIA
CUBA	MALÍ	SUIZA
DINAMARCA	MALTA	SWAZILANDIA
DOMINICA	MARRUECOS	TAILANDIA
ECUADOR	MAURICIO	TAYIKISTÁN
EGIPTO	MAURITANIA, REPÚBLICA	TOGO
EL SALVADOR	ISLÁMICA DE	TRINIDAD Y TABAGO
EMIRATOS ÁRABES UNIDOS	MÉXICO	TÚNEZ
ERITREA	MÓNACO	TURQUÍA
ESLOVAQUIA	MONGOLIA	UCRANIA
ESLOVENIA	MONTENEGRO	UGANDA
ESPAÑA	MOZAMBIQUE	URUGUAY
ESTADOS UNIDOS	MYANMAR	UZBEKISTÁN
DE AMÉRICA	NAMIBIA	VENEZUELA, REPÚBLICA
ESTONIA	NEPAL	BOLIVARIANA DE
ETIOPÍA	NICARAGUA	VIET NAM
EX REPÚBLICA YUGOSLAVA	NÍGER	YEMEN
DE MACEDONIA	NIGERIA	ZAMBIA
FEDERACIÓN DE RUSIA	NORUEGA	ZIMBABWE
FIJI	NUEVA ZELANDIA	

El Estatuto del Organismo fue aprobado el 23 de octubre de 1956 en la Conferencia sobre el Estatuto del OIEA celebrada en la Sede de las Naciones Unidas (Nueva York); entró en vigor el 29 de julio de 1957. El Organismo tiene la Sede en Viena. Su principal objetivo es “acelerar y aumentar la contribución de la energía atómica a la paz, la salud y la prosperidad en el mundo entero”.

DOSIMETRÍA CITOGENÉTICA: APLICACIONES EN MATERIA DE PREPARACIÓN Y RESPUESTA A LAS EMERGENCIAS RADIOLÓGICAS



DERECHOS DE AUTOR

Todas las publicaciones científicas y técnicas del OIEA están protegidas en virtud de la Convención Universal sobre Derecho de Autor aprobada en 1952 (Berna) y revisada en 1972 (París). Desde entonces, la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (Ginebra) ha ampliado la cobertura de los derechos de autor que ahora incluyen la propiedad intelectual de obras electrónicas y virtuales. Para la utilización de textos completos, o parte de ellos, que figuren en publicaciones del OIEA, impresas o en formato electrónico, deberá obtenerse la correspondiente autorización, y por lo general dicha utilización estará sujeta a un acuerdo de pago de regalías. Se aceptan propuestas relativas a reproducción y traducción sin fines comerciales, que se examinarán individualmente. Las solicitudes de información deben dirigirse a la Sección Editorial del OIEA:

Dependencia de Mercadotecnia y Venta
Sección Editorial
Organismo Internacional de Energía Atómica
Centro Internacional de Viena
PO Box 100
1400 Viena (Austria)
fax: +43 1 2600 29302
tel.: +43 1 2600 22417
correo electrónico: sales.publications@iaea.org
<http://www.iaea.org/books>

Para obtener más información sobre esta publicación, sírvanse dirigirse a:

Centro de Respuesta a Incidentes y Emergencias
Departamento de Seguridad Nuclear Tecnológica y Física
Organismo Internacional de Energía Atómica
Centro Internacional de Viena
PO Box 100
1400 Viena (Austria)
correo electrónico: official.mail@iaea.org

DOSIMETRÍA CITOGENÉTICA:
APLICACIONES EN MATERIA DE PREPARACIÓN Y RESPUESTA
A LAS EMERGENCIAS RADIOLÓGICAS
OIEA, VIENA (2014)
EPR-Biodosimetry 2011
© IAEA, 2014
Impreso por el OIEA en Austria
Octubre de 2014

PRÓLOGO

La dosimetría citogenética, método de evaluación de la dosis de reconocida valía, ha venido a colmar una carencia entre las técnicas dosimétricas, en particular cuando existen dificultades para interpretar los datos, cuando hay razones para creer que alguna persona que no porta un dosímetro se ha visto expuesta a la radiación, cuando se reclaman compensaciones por lesiones radiológicas para las que se carece de pruebas dosimétricas inequívocas, o cuando alguien ha estado expuesto a lo largo de toda su vida laboral.

La hoy arraigada participación del OIEA en cuestiones de dosimetría biológica se inició en 1978. La vinculación se produjo a través de una secuencia de proyectos coordinados de investigación (PCI), la realización de cursos de formación regionales y nacionales, el patrocinio de becas de formación personales, y la provisión de equipo de laboratorio en los Estados Miembros para la creación de capacidad en materia de dosimetría biológica.

Sobre esas bases se pasó al asesoramiento a los Estados Miembros acerca de los aspectos que más pueden interesar a las investigaciones, y sobre las técnicas más adecuadas para las actividades futuras en materia de dosimetría biológica.

Como resultado de uno de los PCI se publicó en 1986 un manual de dosimetría biológica con el título de “Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment (Technical Reports Series No. 260)”. En 2001 fue remplazado por una segunda edición, revisada (Technical Reports Series No. 405).

La presente publicación constituye la tercera edición de la obra, que ha sido ampliamente actualizada para plasmar los considerables adelantos registrados en biodosimetría citogenética durante el último decenio.

El OIEA desea expresar su agradecimiento a todos los autores y revisores de la publicación. Se reconocen especialmente las importantes contribuciones del Dr. D. Lloyd.

La publicación ha sido cofinanciada por la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud.

E. Buglova, del Departamento de Seguridad Nuclear Tecnológica y Física, ha sido la funcionaria del OIEA responsable de la publicación.

NOTA EDITORIAL

Las denominaciones concretas de países o territorios empleadas en esta publicación no implican juicio alguno por parte del editor, el OIEA, sobre la condición jurídica de dichos países o territorios, de sus autoridades e instituciones, ni del trazado de sus fronteras.

La mención de nombres de determinadas empresas o productos (se indiquen o no como registrados) no implica ninguna intención de violar derechos de propiedad ni debe interpretarse como una aprobación o recomendación por parte del OIEA.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Objetivo	4
1.3. Alcance e historia del desarrollo.....	4
1.4. Estructura.....	5
2. APLICACIÓN DE CONCEPTOS DE DOSIS EN DOSIMETRÍA BIOLÓGICA	7
3. ANTECEDENTES BIOFÍSICOS SOBRE LAS LESIONES CROMOSÓMICAS	9
4. LINFOCITOS HUMANOS	15
5. ESTRUCTURA DE LOS CROMOSOMAS	19
5.1. Empaquetamiento de la cromatina.....	19
5.2. Cariotipo humano y contenido de ADN de los cromosomas	19
5.3. Ciclo celular.....	23
6. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS INDUCIDAS POR LA RADIACIÓN.....	25
6.1. Lesiones del ADN inducidas por la radiación	25
6.2. Aberraciones de tipo cromosómico	27
6.3. Aberraciones de tipo cromatídico	33
6.4. Condensación prematura de los cromosomas.....	35
6.5. Micronúcleos	37
7. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE.....	41
7.1. Secuencia cronológica	41
7.2. Anticoagulante	41
7.3. Contenedores	42
7.4. Transporte	42
8. OBTENCIÓN <i>IN VITRO</i> DE UNA CURVA DE DOSIS-RESPUESTA	45
8.1. Consideraciones generales.....	45
8.2. Consideraciones físicas.....	45
8.3. Consideraciones estadísticas.....	48
9. ANÁLISIS DE DICÉNTRICOS	53
9.1. Cultivo	53
9.2. Procedimiento de fijación	57
9.3. Tinción.....	58
9.4. Análisis de las preparaciones.....	61
9.5. Registro de los datos	62
9.6. Almacenamiento de la información y las preparaciones	63
9.7. Estimación de la dosis	63
10. ANÁLISIS DE TRASLOCACIONES.....	83
10.1. Cultivo celular y procedimientos de fijación.....	85
10.2. Pintura de los cromosomas	86
10.3. Criterios de examen	87
10.4. Manejo de los datos	89
10.5. Nivel de control de las traslocaciones	91

10.6. Persistencia de las traslocaciones	95
10.7. Curvas de calibración	96
10.8. Ejemplos de FISH utilizados en dosimetría biológica retrospectiva	98
11. ANÁLISIS CON CONDENSACIÓN PREMATURA DE LOS CROMOSOMAS (PCC)	105
11.1. PCC por fusión mitótica	105
11.2. PCC por inducción química.....	110
11.3. Accidente de radiación investigado con el método de los anillos PCC.....	113
12. PRUEBA DE MICRONÚCLEOS CON BLOQUEO DE LA CITOCINESIS (CBMN).....	115
12.1. Antecedentes.....	115
12.2. Cultivo de linfocitos para la prueba CBMN	116
12.3. Criterios de examen de la prueba CBMN.....	116
12.4. Manejo de los datos de la prueba CBMN	118
12.5. Aplicación de la prueba CBMN en dosimetría biológica.....	122
13. AUTOMATIZACIÓN DE LAS PRUEBAS CROMOSÓMICAS.....	127
13.1. Procesamiento automatizado de las muestras.....	127
13.2. Análisis automatizado de la imagen	128
13.3. Sistema de gestión de la información de laboratorio (LIMS).....	133
14. SUCESOS QUE PROVOCAN VÍCTIMAS EN GRAN ESCALA	135
14.1. Posibles escenarios de exposición radiológica	135
14.2. Experiencia histórica	136
14.3. Función de la dosimetría biológica.....	137
14.4. Estrategias actuales cuando hay víctimas en gran escala	139
15. PROGRAMAS DE CALIDAD Y NORMAS ISO	143
15.1. Justificación de un programa de garantía y control de la calidad.....	143
15.2. Estructura actual del documento ISO 19238 [3].....	144
15.3. Aplicación al triaje de poblaciones.....	145
16. SEGURIDAD DEL PERSONAL DE LABORATORIO	149
16.1. Infecciones.....	149
16.2. Protección ocular	150
16.3. Productos químicos.....	150
REFERENCIAS	153
ANEXO I PRUEBA DE DICÉNTRICOS	173
ANEXO II PRUEBA DE TRASLOCACIONES CON FISH.....	177
ANEXO III CONDENSACIÓN PREMATURA DE CROMOSOMAS.....	181
ANEXO IV PRUEBA DE MICRONÚCLEOS CON BLOQUEO DE LA CITOCINESIS	187
ANEXO V CRITERIOS PARA DETERMINAR EL ÍNDICE MITÓTICO	193
ANEXO VI ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	195
ANEXO VII EJEMPLO DE EJERCICIO DE COMPARACIÓN ENTRE LABORATORIOS CON FINES DE GARANTÍA DE LA CALIDAD	205

REFERENCIAS DE LOS ANEXOS	209
LISTA DE SIGLAS	211
DEFINICIONES	215
COLABORADORES EN LA PREPARACIÓN Y REVISIÓN.....	229
RECONOCIMIENTO POR LAS OBSERVACIONES RECIBIDAS	231

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

La dosimetría biológica, basada en el análisis de cromosomas dicéntricos teñidos, se utiliza desde mediados del decenio de 1960. Desde entonces, la técnica de análisis de dicéntricos ha registrado grandes mejoras, hasta el punto de que ha pasado a formar parte sistemáticamente de los programas de protección radiológica de muchos Estados Miembros [1]. La experiencia adquirida en su aplicación en centenares de casos de sobreexposiciones, reales o presuntas, ha demostrado la valía del método y ha contribuido a definir sus limitaciones. La importancia de la dosimetría biológica mediante biomarcadores de lesiones cromosómicas radica principalmente en que, a diferencia de la medición física de la dosis, tiene en cuenta la variación de la sensibilidad entre individuos.

Hay que destacar que las aberraciones cromosómicas se utilizan a modo de dosímetro, y contribuyen, a menudo de forma importante, a la información que hay que reunir y considerar cuando se investiga una emergencia nuclear o radiológica¹ [2]. La información para el diagnóstico puede proceder de otros biomarcadores de base biológica, así como de los signos y síntomas clínicos mostrados por las personas, y también de mediciones físicas tales como las realizadas por dispositivos de monitorización individual o de termoluminiscencia, luminiscencia estimulada ópticamente o resonancia de espín electrónico en elementos de matriz sólida de las personas irradiadas (por ejemplo, esmalte de los dientes, uñas, muestras de hueso, etc.) o elementos accesorios (relojes, gafas, etc.). También puede facilitar el cálculo de la dosis la información obtenida interrogando a los pacientes y los testigos acerca de datos básicos tales como la hora local o la distancia a la fuente de radiación. Todas esas informaciones se pueden combinar con los datos de dosimetría biológica para obtener una evaluación más clara del caso.

Durante muchos años, la prueba de dicéntricos realizada con linfocitos de la sangre ha sido el único método de dosimetría biológica disponible, y aún hoy sigue siendo la técnica utilizada más a menudo. Se pueden observar dicéntricos y otras aberraciones también en fibroblastos de la piel y células epiteliales de la boca, pero la presente publicación no se ocupa de ellas, pues el ámbito de la obra se limita a las pruebas con linfocitos sanguíneos. Ello no obstante, actualmente se utilizan también cierto número de otros efectos biológicos tales como los micronúcleos, las traslocaciones y las aberraciones de cromosomas sometidos a condensación prematura (figura 1 y cuadro 1), que se pueden analizar en los linfocitos y que sí se describen aquí.

¹ En este contexto, “emergencia radiológica” significa lo mismo que “emergencia nuclear o radiológica”.

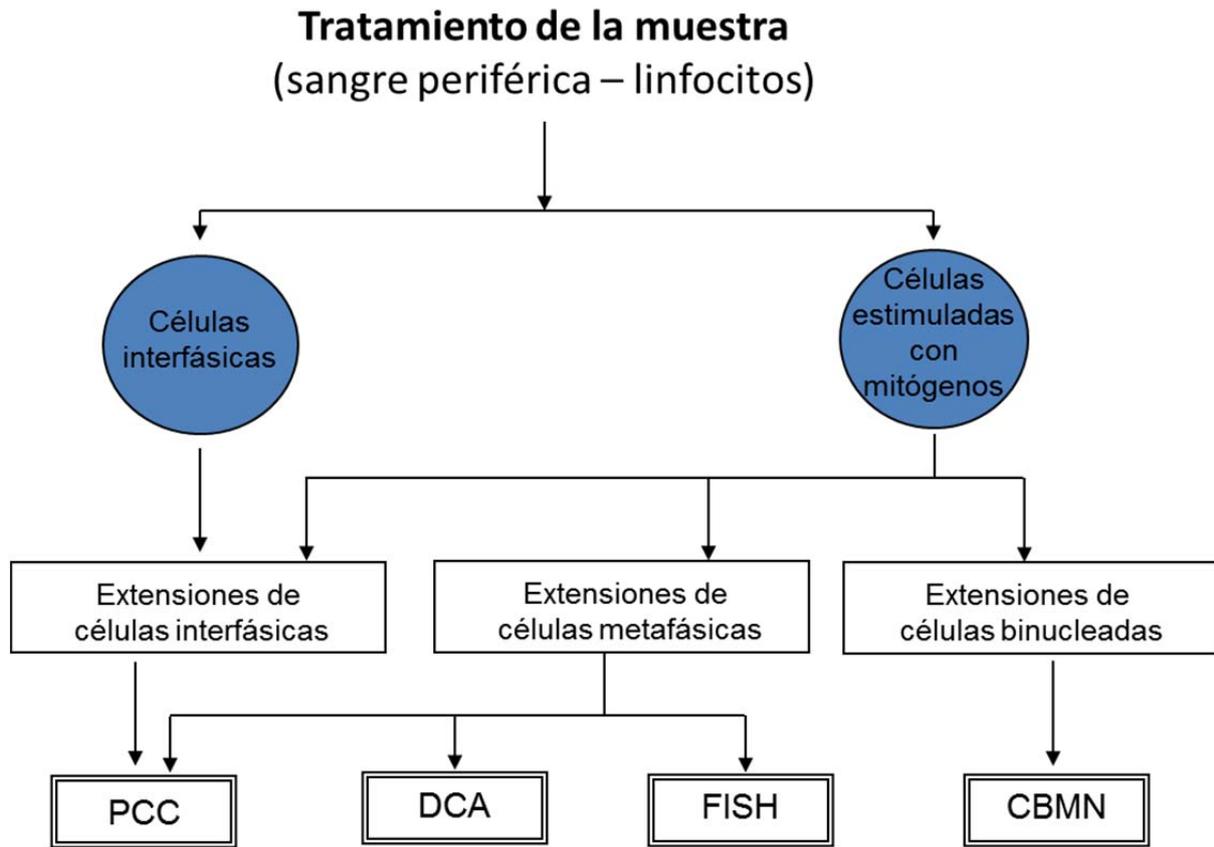


Fig. 1. Esquema del tratamiento de las muestras de linfocitos de sangre periférica para diversas pruebas citogenéticas de aberraciones cromosómicas, a saber, condensación cromosómica prematura (PCC), prueba de dicéntricos (y anillos) en extensiones metafásicas (DCA), prueba de traslocaciones en extensiones metafásicas por hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH), y prueba de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN), utilizadas para evaluar la dosis.

CUADRO 1. COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS CITOGENÉTICAS DE ABERRACIONES UTILIZADAS PARA EVALUAR LA DOSIS^a

	Pruebas citogenéticas de aberraciones			
	Condensación prematura de cromosomas (PCC)	Dicéntricos (y anillos) (DCA)	Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	Micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN)
Aberraciones recontadas habitualmente en las aplicaciones de dosimetría biológica	fragmentos cromosómicos en exceso; dicéntricos ^b y anillos traslocaciones ^b	dicéntricos ^b (y anillos)	dicéntricos ^b (y anillos) traslocaciones ^b	micronúcleos puentes nucleoplásmicos
Escenarios radiológicos habituales de la aplicación	exposición aguda exposición reciente	exp. aguda prolongada exp. reciente	exp. aguda prolongada exp. antigua	exp. aguda prolongada exp. reciente
Equivalente en fotones, en el margen de las dosis agudas (Gy) para la evaluación de la dosis para el cuerpo entero	0,2 a 20	0,1 a 5	0,25 a 4	0,3 a 4
Útil para las aplicaciones de exposición parcial del cuerpo	Sí	Sí	NA ^c	NA
Útil para la evaluación de la dosis de triaje	Sí	Sí	NA	Sí
Situación de la estandarización de la prueba	NA	normas ISO [3, 4]	NA	norma ISO — pendiente, y [5]

^a Cuadro modificado a partir del manual de TMT [6].

^b Aberraciones cromosómicas específicas detectadas habitualmente utilizando sondas de hibridación de ADN específicas para centrómeros y cromosomas enteros.

^c NA: no se aplica o no disponible.

En otras pruebas, que se apartan del ámbito de esta publicación, se utilizan efectos moleculares que miden roturas del ADN, cambios en la regulación de algunos genes centinela, o la presencia de proteínas biomarcadoras detectables dentro de las células o en el suero o el plasma sanguíneo. Se trata de una esfera en la que están emergiendo tecnologías con gran rapidez, y en la que cierto número de pruebas se encuentran en distintas fases de desarrollo y verificación. La variedad de opciones de dosimetría biológica disponibles ha propiciado que se hayan formulado propuestas para un planteamiento multiparamétrico en la investigación de las personas sobreexpuestas [7], y la disponibilidad de varias pruebas puede resultar particularmente útil cuando un laboratorio tiene que afrontar un suceso que haya producido un gran número de víctimas.

Por varias razones, en la investigación de las emergencias radiológicas es importante estimar la dosis impartida a las personas expuestas. En el caso de las exposiciones altas (>1 Gy agudo), la información sobre las dosis puede facilitar la planificación del tratamiento

y alertar a los médicos acerca de las probables consecuencias determinísticas en la salud (lesiones tisulares) que se pueden registrar en las semanas y meses siguientes.

En las exposiciones inferiores al nivel que hace necesario el tratamiento, la información dosimétrica es importante para que el médico pueda asesorar a las personas irradiadas acerca del riesgo de que puedan sufrir consecuencias estocásticas, es decir, cáncer. En el caso de las personas cuya exposición ha sido muy baja, saber que no se ha constatado ningún aumento significativo de las lesiones cromosómicas suele ser muy tranquilizador. Así ocurre en particular cuando se conocen mal los detalles del suceso y no se dispone de mediciones o cálculos de la dosis física. Puede que entonces la dosimetría biológica sea el único modo de cuantificar la dosis, aunque, como se verá, algunos factores tales como la falta de uniformidad de la exposición, la incorporación de radionucleidos o el retraso en la obtención de muestras de sangre pueden entorpecer la cuantificación.

La dosimetría biológica puede desempeñar también una valiosa función en los momentos inmediatamente posteriores a una emergencia radiológica o un ataque terrorista, cuando el número de personas expuestas puede ser muy alto. En ese momento es necesario realizar el triaje de las víctimas examinando los efectos biológicos y clínicos que permitan efectuar una rápida identificación inicial de los individuos presuntamente expuestos a dosis potencialmente mortales, así como obtener una dosis de triaje.

1.2. OBJETIVO

El objetivo principal de la presente publicación es proporcionar al lector información técnica para, tras una exposición accidental a radiación ionizante, seleccionar y aplicar de forma estandarizada la técnica citogenética apropiada para obtener una evaluación de la dosis que sea comparable. En la publicación se describen los cuatro posibles métodos citogenéticos (figura 1 y cuadro 1) disponibles en la actualidad para la dosimetría biológica. Es apropiado que se disponga fácilmente de todas esas técnicas en las principales regiones geográficas, pero si existe cierto grado de cooperación e interrelación, no es necesario que todos los laboratorios nacionales de dosimetría biológica dispongan de todas ellas.

1.3. ALCANCE E HISTORIA DEL DESARROLLO

El primer manual de esta serie [1] se centraba exclusivamente en la prueba de dicéntricos. Esa oportuna publicación constituyó un valioso y frecuentemente citado hito en dosimetría biológica. Se había redactado para dos niveles de lectura. En primer lugar, para que sirviera de manual de laboratorio y constituyera una fuente de información técnica completa y conveniente. Además, se trataba de proporcionar un resumen conciso de los antecedentes técnicos del tema, para su uso en la enseñanza de la radiobiología o para personas tales como especialistas en física médica, abogados o formuladores de políticas, que pudieran necesitar cierto grado de conocimiento profesional de la dosimetría biológica.

En una edición revisada del manual [8], publicada 15 años más tarde, se incluyeron las pruebas de pintado cromosómico con FISH, condensación prematura de los cromosomas (PCC) y de micronúcleos (CBMN).

Ahora, 10 años después, se ha preparado el presente documento. Gran parte del texto original sobre la prueba de aberraciones cromosómicas de dicéntricos (y anillos) en extensiones metafásicas (DCA) de ediciones precedentes sigue siendo válido y se ha conservado, apropiadamente actualizado. Las pruebas FISH, PCC y CBMN han sido profundamente revisadas a la luz de las investigaciones recientes y la experiencia adquirida con su uso. Era inevitable que a lo largo de los 25 años que abarcan estas tres ediciones la dosimetría citogenética se haya ampliado considerablemente y haya ganado complejidad técnica. Ello no obstante, la presente edición se ha preparado de modo que un laboratorio

mínimamente equipado que se incorpore ahora a este campo no se sienta demasiado intimidado. Sigue siendo posible extraer material solo de las secciones que se refieren a las dos pruebas básicas más importantes que hay que poner a punto, a saber, las de dicéntricos y de micronúcleos. Se proporciona asesoramiento claro sobre el modo de aplicarlas en la práctica, obtener curvas básicas de dosis-respuesta e interpretar los datos obtenidos en las investigaciones de los casos de sobrexposición.

Una importante novedad de los últimos años, plasmada en esta revisión, han sido los arreglos para realizar el triaje en los sucesos radiológicos que provocan víctimas en gran escala. Se proporcionan consideraciones sobre el modo en que los laboratorios de dosimetría biológica pueden responder a un aumento brusco del número de casos utilizando las pruebas en la modalidad de triaje, acelerando los análisis mediante la microscopía asistida por ordenador y estableciendo redes con otros laboratorios. Coincidiendo con este aumento de la colaboración en la respuesta a las emergencias se han preparado directrices internacionales sobre garantía y control de calidad y participación en ejercicios de comparación entre laboratorios. Todos esos temas se abordan en la presente revisión.

Las pruebas citogenéticas de utilidad en dosimetría biológica son múltiples, puesto que ninguna es por sí sola suficientemente robusta para abarcar todos los posibles escenarios radiológicos, incluidas las exposiciones agudas de la fase temprana, las exposiciones parciales del cuerpo, las exposiciones retrospectivas o pretéritas (es decir, la obtención de muestras biológicas años después de la exposición) o las aplicaciones en que interviene la citogenética de triaje en los sucesos radiológicos que provocan víctimas en gran escala.

1.4. ESTRUCTURA

La publicación se ha estructurado del modo siguiente. Después de esta introducción (sección 1), en la sección 2 se examina el significado de la “dosis” determinada a partir de las lesiones cromosómicas y la relación que guarda con los valores de la dosis personal calculada por métodos físicos y el concepto de dosis equivalente según la define la Comisión Internacional de Protección Radiológica (ICRP). En la sección 3 se proporcionan antecedentes biofísicos y microdosimétricos sobre la inducción de lesiones cromosómicas. A continuación, en la sección 4, se ofrece una breve descripción de los linfocitos humanos, de los que forman parte las células T utilizadas en dosimetría biológica. En la sección 5 se describe a grandes rasgos la estructura de los cromosomas. En la sección 6 se examinan los tipos de lesiones del ADN inducidos por las interacciones con la radiación ionizante y se proporciona una descripción y la clasificación de las alteraciones cromosómicas observadas en los linfocitos después de la irradiación. En la sección 7 se describen los requisitos de la obtención de muestras de sangre, y en la sección 8 se consideran los requisitos físicos, biológicos y estadísticos para obtener curvas de dosis-respuesta. A continuación, en las secciones 9, 10, 11 y 12, se describen las técnicas de dosimetría biológica basadas en los cuatro efectos citogenéticos, a saber: los dicéntricos, las traslocaciones, sobre la base de la hibridación in situ con sondas fluorescentes, los cromosomas condensados prematuramente, y los micronúcleos. En la sección 13 se exponen los considerables adelantos realizados estos últimos años en el desarrollo del análisis automatizado de las pruebas cromosómicas, y en la sección 14 se considera otra reciente novedad, a saber, el modo en que la comunidad dedicada a la dosimetría cromosómica puede responder de forma eficaz a los sucesos que provocan víctimas en gran escala. En la sección 15 se proporcionan orientaciones y procedimientos sobre garantía de calidad y, en la última sección, la 16, se examina la seguridad del personal de laboratorio que realiza los análisis citogenéticos. La exhaustiva lista actualizada de referencias va seguida de siete anexos, en los primeros cuatro de los cuales se describen protocolos de trabajo reproducibles para las pruebas de DCA, de traslocaciones basada en FISH, PCC y CBMN. En el anexo V se describen los criterios para medir el índice mitótico, y

en el anexo VI figura una guía sobre varias pruebas estadísticas utilizadas habitualmente en el análisis de los datos de dosimetría biológica y las investigaciones subyacentes. En el último anexo, el VII, se presenta un ejemplo desarrollado de ejercicio de garantía de calidad entre laboratorios sobre recuento de dicéntricos y estimación de la dosis. La obra finaliza con un lista de las abreviaciones utilizadas, un glosario de términos técnicos importantes y, por último, una lista de las personas que han contribuido a la redacción y el examen colegiado de esta tercera, y muy revisada, edición de la publicación.

2. APLICACIÓN DE CONCEPTOS DE DOSIS EN DOSIMETRÍA BIOLÓGICA

En la presente sección se informa brevemente sobre expresiones dosimétricas, sobre el significado físico de dosis absorbida y sobre su interpretación en la evaluación biológica (citogenética) de la dosis en caso de exposición accidental a diferentes tipos de radiaciones ionizantes.

Para calcular la dosis absorbida por las personas sobreexpuestas se utilizan las aberraciones cromosómicas presentes en los linfocitos. Las aberraciones recontadas en los linfocitos se interpretan en términos de dosis absorbida respecto de una curva de calibración dosis-respuesta. La curva se habrá obtenido exponiendo sangre *in vitro* a dosis de la calidad de radiación apropiada. Las dosis aplicadas a las muestras deberían poder trazarse mediante un instrumento físico, por ejemplo, una cámara de ionización, respecto de un patrón primario o secundario.

Los dispositivos físicos que miden fotones o neutrones se suelen calibrar en unidades de kerma en aire y, por consiguiente, al considerar las dosis transmitidas a tejidos (o muestras de sangre) es necesario aplicar factores de corrección. Para los fotones, esos factores se obtienen a partir de la razón de los coeficientes másicos de absorción de energía, y los valores que hay que utilizar se pueden obtener a partir de tablas normalizadas [9]. Para los neutrones se pueden fabricar instrumentos con material equivalente al tejido y, de ese modo, indicar las dosis impartidas al tejido. Algunos laboratorios de dosimetría primaria o secundaria, en cambio, calibran respecto de la fluencia de neutrones, que se puede convertir a dosis impartida al tejido.

Dado que el efecto biológico que se recuenta son las aberraciones cromosómicas, en términos estrictos estas son un reflejo de la dosis impartida a los núcleos celulares. Para los fotones y los neutrones, la dosis impartida a los tejidos blandos constituye una aproximación muy buena de la dosis impartida al núcleo. La razón es que el diámetro del núcleo de los linfocitos es pequeño, $\sim 6 \mu\text{m}$, respecto de los recorridos de las partículas secundarias producidas por los fotones y los neutrones, por lo que se puede aplicar la teoría de la cavidad de Bragg-Gray [10].

Sin embargo, existen unas pocas excepciones. Por ejemplo, en la exposición a agua tritiada, las distancias recorridas por la partícula beta se sitúan en el intervalo de $0\text{--}7 \mu\text{m}$. Por consiguiente, la mayor parte de la dosis impartida a un núcleo celular se debe a las emisiones del tritio contenido en el interior de ese núcleo. En este caso, la base de la calibración es la dosis impartida al núcleo del linfocito, que depende del contenido de agua del núcleo, respecto del de la sangre [11]. Otro ejemplo podría ser la exposición a neutrones de baja energía, inferior a alrededor de 100 keV , cuyos protones de retroceso tienen recorridos inferiores a $2 \mu\text{m}$. En este caso, la dosis impartida al núcleo del linfocito guardaría relación con su contenido de hidrógeno. Sin embargo, es poco probable que un accidente provoque la exposición a neutrones situados predominantemente en este rango de energía.

El valor de la dosis obtenido refiriendo a una curva de calibración una cantidad medida de aberraciones, por ejemplo, dicéntricas, representa un promedio de la dosis impartida a los linfocitos que se ha absorbido. El valor correspondería aproximadamente al promedio de la dosis correspondiente al cuerpo entero, porque los linfocitos se distribuyen ampliamente por todo el cuerpo y son móviles. Mediante métodos que se describirán más adelante en esta publicación, a veces se puede perfeccionar el cálculo de la dosis para el cuerpo entero en situaciones donde se han producido irradiaciones no uniformes o parciales procedentes de fuentes externas.

La mayoría de los radionucleidos incorporados internamente también provocan irradiaciones no uniformes, pero en este caso la dosis que interesa no es la impartida a los linfocitos sino la impartida a los órganos y tejidos concretos donde se deposita la radiactividad. A menudo, la utilidad del análisis cromosómico se ve limitada en cierto modo porque, por ejemplo, después de la incorporación de radioyodo se inducirán aberraciones en los linfocitos, pero estas no se pueden interpretar respecto de la dosis impartida a la tiroides. Una excepción a este caso son los nucleidos que están muy distribuidos por el cuerpo por el cuerpo, como el agua tritiada o el radiocesio, pues la experiencia muestra que el análisis de las aberraciones linfocitarias proporciona una estimación válida de la dosis.

En dosimetría biológica de carácter retrospectivo, un decenio o más después de la exposición, donde las traslocaciones se miden por el método FISH, la estimación de la dosis representa un promedio de la dosis impartida a la médula ósea activa. La razón es que la exposición original se impartió a las células madres precursoras de los linfocitos objeto de examen. En periodos más breves, las traslocaciones se observarán en una mezcla de linfocitos de larga duración y linfocitos descendientes de las células madre irradiadas.

A menudo, el desencadenante de una investigación es una medición rutinaria de la dosis registrada en un dosímetro personal. Por regla general, los dosímetros personales se calibran para medir la dosis equivalente personal a una profundidad especificada. Esa cantidad operacional proporciona una estimación razonable de la dosis efectiva o la dosis equivalente para la mayoría de los campos de radiación que se manejan en la práctica. La dosis efectiva y la dosis equivalente están ideadas para ser utilizadas en protección radiológica. No son adecuadas para determinar los efectos de la absorción de altas dosis.

Por consiguiente, se recomienda que los laboratorios que realizan dosimetrías biológicas calibren sus procedimientos respecto de la dosis absorbida (Gy), especificando, cuando proceda, los pormenores suficientes para definir el tipo y la calidad de la radiación [12–15].

3. ANTECEDENTES BIOFÍSICOS SOBRE LAS LESIONES CROMOSÓMICAS

En esta sección se proporciona información destinada a facilitar la comprensión e interpretación de los principios que subyacen a la metodología expuesta en las secciones posteriores. En las ref. [16, 17] figura información complementaria.

Cuando la radiación ionizante atraviesa un objeto, expulsa electrones de los átomos por los que se desplaza, dejando iones cargados positivamente. La distribución de los eventos primarios, ionizaciones y excitaciones a lo largo de la trayectoria de la partícula ionizante, variará en función del tipo de radiación. El promedio de separación de esos eventos primarios disminuye a medida que aumenta la carga y la masa de las partículas (neutrones o partículas alfa). Como se verá más adelante, es necesario que la definición de una radiación en particular se haga en términos de la cantidad de energía depositada por unidad de longitud de la trayectoria, puesto que esta característica modifica la eficacia con que el tipo particular de radiación induce diversos efectos biológicos.

Una expresión comparativa útil para describir la deposición de energía por diferentes tipos de radiación es la transferencia lineal de energía (TLE). Para las radiaciones que presentan una amplia gama de TLE, por ejemplo, los neutrones, se puede deducir una TLE promedio, que se puede obtener ponderando cada intervalo de TLE en función de la energía impartida (o dosis) o según la longitud de la trayectoria recorrida. Se obtienen así, respectivamente, las TLE de dosis promedio y de trayectoria promedio. La trayectoria promedio parece ser la cantidad que mejor describe las variaciones de la eficacia biológica relativa (EBR) correspondientes al daño cromosómico [18]. La TLE de trayectoria promedio para rayos X de 250 kVp (máximo de kilovoltios) es de alrededor de 2 keV/ μm , mientras que las partículas pesadas cargadas tienen valores de TLE de trayectoria promedio de 100–2 000 keV/ μm o superiores. El punto que es importante considerar es que para un mismo tipo o diversos tipos de radiación, la cantidad de energía depositada por micrómetro de trayectoria puede diferir considerablemente, lo que puede alterar claramente la eficacia biológica de diferentes tipos de radiación.

Una consecuencia de la distribución de la ionización para radiaciones de distintas TLE es la distribución de frecuencias de las aberraciones cromosómicas entre las células. Para radiaciones ionizantes de baja TLE, o de escasa densidad de ionización, la ionización producida con una dosis particular cualquiera se distribuirá aleatoriamente entre las células, en particular porque habrá un número muy elevado de trayectorias. Las lesiones del ADN también se distribuirán aleatoriamente entre las células y, dando por supuesto que las lesiones tienen la misma probabilidad de convertirse potencialmente en una aberración, las aberraciones también se distribuirán aleatoriamente entre las células. Así se ha visto que era el caso después de las irradiaciones con rayos X y γ , en las que las aberraciones cromosómicas se ajustan a una distribución de Poisson. Cuando se trata de radiaciones de alta TLE, o de alta densidad de ionización, las trayectorias de ionización no se distribuirán aleatoriamente entre las células y la energía se depositará en “paquetes discretos”. El número de trayectorias será mucho más bajo que en el caso de la radiación de baja transferencia lineal de energía a dosis equivalentes. El resultado, con los mismos supuestos que para las radiaciones de baja transferencia lineal de energía, es que las aberraciones inducidas no se distribuirán aleatoriamente entre las células. Para cualquier frecuencia media observada de aberraciones habrá más células con aberraciones múltiples o sin aberraciones que las previstas a partir de una distribución de Poisson. Estas características se pueden aprovechar en dosimetría biológica, como se verá en la sección 9.7.4.3, en particular en lo que se refiere a las exposiciones no uniformes o parciales del cuerpo.

La eficacia con que los distintos tipos de radiación inducen un efecto concreto se suele representar mediante la expresión “eficacia biológica relativa” (EBR). La EBR se define

como la razón entre la dosis de radiación de referencia (ordinariamente, rayos X de ortovoltaje) y la dosis de la radiación objeto de estudio que produce el mismo efecto biológico. Es decir,

$$EBR = \frac{\text{dosis de rayos X de 200-250 kVp que producen el efecto Z}}{\text{dosis de radiación que produce el efecto Z}}$$

Téngase presente que los rayos X son 2 a 3 veces más eficaces que los rayos gamma y que, por consiguiente, la radiación de referencia se debería definir siempre [19].

En la figura 2 se muestran las curvas de dosis-respuesta para dicéntricos, de forma típicamente lineal y lineal cuadrática, obtenidas, respectivamente, con radiaciones de alta y de baja transferencia lineal de energía.

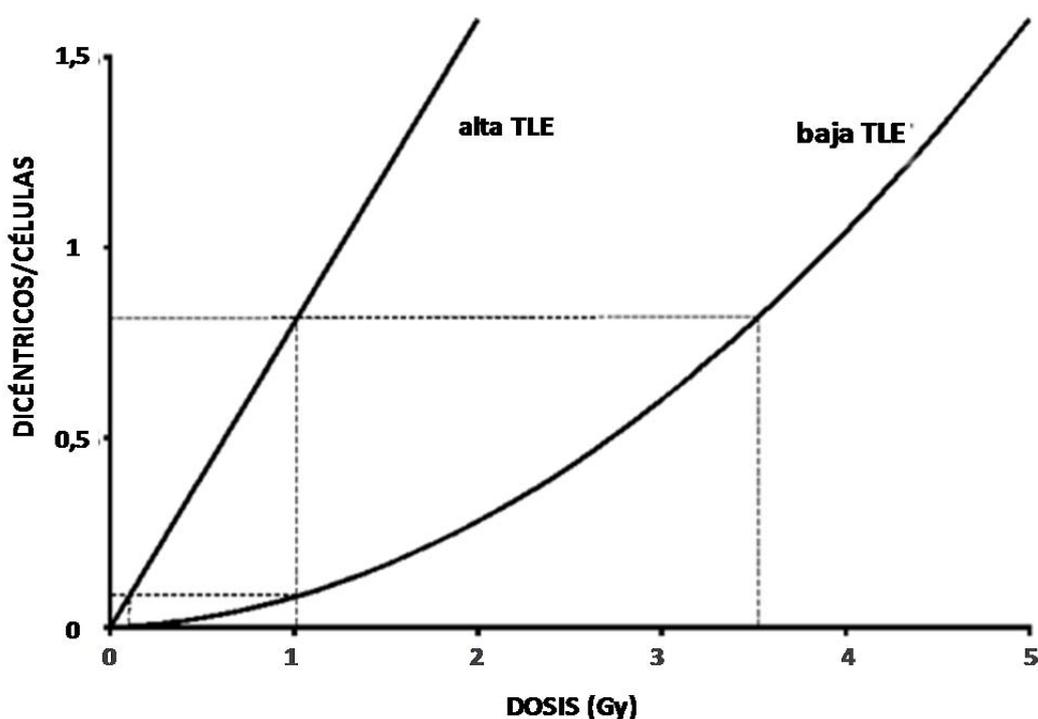


Fig. 2. Curvas de dosis-respuesta típicas, lineal y lineal cuadrática, en las que se muestra la variación de la EBR en función del efecto [8].

La razón de que adopten formas distintas se examina más adelante en esta misma sección. La línea punteada horizontal superior que cruza las curvas a 1,0 y 3,5 Gy ilustra una EBR con alta producción de dicéntricos asociada a dosis altas. La EBR es la razón de las dos dosis, es decir, $3,5/1,0 = 3,5$. Los cruces de la línea punteada horizontal inferior se producen a 0,1 y 1,0 Gy, lo que da una EBR más elevada: $1,0/0,1 = 10$. La EBR máxima, que describe la situación a dosis bajas, suele representarse por EBR_m y sería la razón de los coeficientes lineales de las ecuaciones de las dos curvas.

Se ha demostrado que para muchos efectos (mutaciones, muerte celular y aberraciones cromosómicas) la EBR varía en función de la TLE, obteniéndose una curva de respuesta en forma de joroba (figura 3).

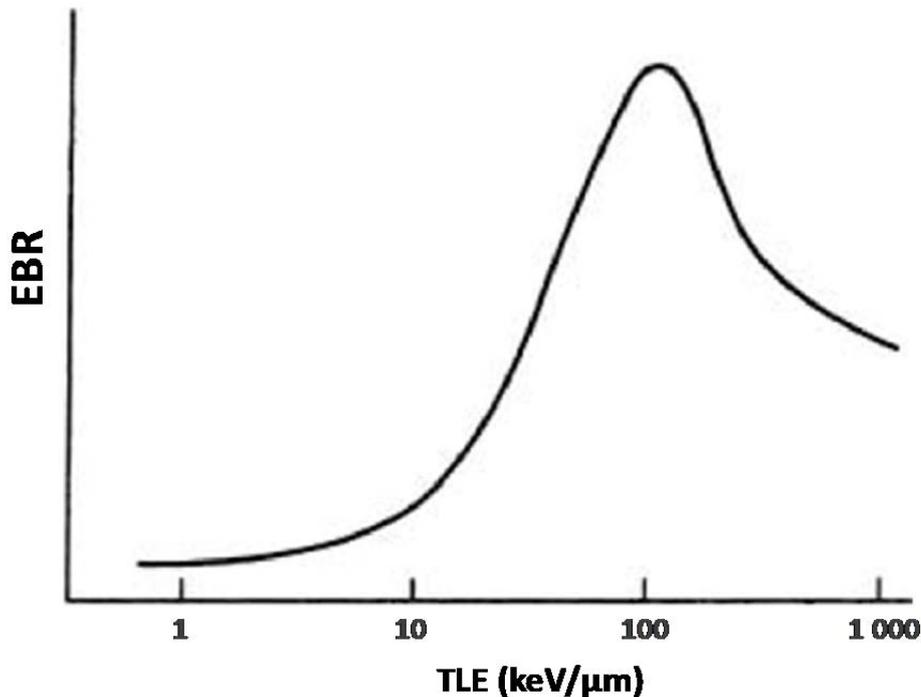


Fig. 3. Relación general entre la EBR y la TLE [8].

La curva muestra que la EBR aumenta hasta un valor óptimo de alrededor de 100 keV/μm y luego disminuye para valores más altos de TLE. La interpretación de la curva se considera aquí de modo óptimo para la inducción de aberraciones cromosómicas. A efectos ilustrativos, la aberración dicéntrica se utiliza como ejemplo en parte porque entraña con claridad una interacción (o intercambio) entre dos cromosomas, y también porque es el tipo de aberración utilizado más frecuentemente en dosimetría biológica.

Para producir una aberración dicéntrica es necesario inducir una lesión en el ADN de los dos cromosomas no replicados correspondientes tal que los cromosomas dañados puedan realizar un intercambio. El intercambio se puede producir como consecuencia de la reparación incorrecta de las roturas inducidas directamente por la radiación en las cadenas de ADN o como consecuencia del fallo de la reparación por excisión de las bases dañadas. Por consiguiente, como se ve, para que se produzcan esos errores de reparación, las lesiones de los dos cromosomas tienen que estar próximas, dentro de lo que se denomina “distancia de reunión”. Esa región concreta se puede considerar la diana. Es necesario que dentro de la diana se produzcan dos lesiones, una en la doble hélice de ADN de cada uno de los cromosomas no replicados. La diana, o zona de interacción, es pequeña y suele considerarse que tiene un diámetro inferior a 1,0 μm. Los rayos X tienen TLE bajas, con bajas frecuencias de ionización por unidad de longitud de trayectoria. Por consiguiente, es baja la probabilidad de que en el interior de la diana se produzcan dos ionizaciones por causa de una misma trayectoria. Se precisan un mínimo de dos ionizaciones para dañar los dos cromosomas que participan en un dicéntrico. Es mucho más alta la probabilidad de que se produzcan dos lesiones por ionización en dos trayectorias independientes. Los dicéntricos producidos por una trayectoria tendrán una frecuencia proporcional a la función lineal de la dosis, mientras que los dicéntricos inducidos por dos trayectorias tendrán una frecuencia proporcional al cuadrado de la dosis. A dosis inferiores a los 0,5 Gy, la probabilidad de que dos trayectorias atraviesen una diana es suficientemente baja para que los dicéntricos sean producto casi exclusivamente de una sola trayectoria y con una frecuencia baja. A medida que aumenta la dosis aumentará también la contribución de los dicéntricos inducidos por dos trayectorias. Por

consiguiente, la curva de dosis-respuesta para dicéntricos inducidos por TLE bajas (figura 2) será una combinación de eventos de una y de dos trayectorias, siendo los primeros más frecuentes a dosis bajas y los últimos mucho más frecuentes a dosis altas. Se suele considerar que la curva de dosis-respuesta se ajusta a la ecuación (2)

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (2)$$

donde:

Y es la producción de dicéntricos,

D es la dosis,

C es el control (frecuencia de base),

α es el coeficiente lineal, y

β es el coeficiente del cuadrado de la dosis.

La razón α/β se puede denominar dosis de cruce. Equivale a la dosis a la que los componentes lineal y cuadrático contribuyen por igual a la formación de dicéntricos.

A medida que la TLE de la radiación aumenta hasta un máximo, aumenta la probabilidad de que dos lesiones de la diana hayan sido inducidas por dos eventos de ionización de la misma trayectoria, lo cual tiene dos consecuencias. La curva de dosis-respuesta para transferencias de energía lineal superiores a aproximadamente 20 keV/ μm es lineal (figura 2), y la eficiencia, la EBR, en la inducción de dicéntricos de la radiación de TLE más alta aumenta a medida que aumenta la TLE, como consecuencia del aumento de la probabilidad de que se produzcan dos lesiones en una misma trayectoria. La producción de las dos lesiones en una sola trayectoria es mucho más eficiente que el proceso estocástico de que una segunda trayectoria produzca una lesión cerca de una lesión producida anteriormente por otra trayectoria, en particular a dosis bajas, en las que la densidad de trayectorias es baja. La EBR máxima se dará para un valor de TLE en el que la ionización esté espaciada de manera óptima para producir lesiones en las dos hélices de ADN que participan en la formación de dicéntricos sin “desperdiciar” energía, es decir, sin provocar en la diana más ionizaciones de las necesarias. Sin embargo, cuando la TLE supera su valor óptimo, se depositará en la diana más energía de lo necesario y, en esas circunstancias, la EBR disminuirá a medida que aumenta la TLE, como muestra la representación gráfica de EBR frente a TLE de la figura 3.

En resumen, la curva de dosis-respuesta (figura 2) para radiaciones de baja TLE, protones de alta energía y neutrones rápidos será no lineal y se ajustará óptimamente a un modelo lineal cuadrático; la curva de dosis-respuesta para radiaciones de alta TLE (neutrones de fisión y partículas alfa) será lineal, o casi lineal; la EBR aumenta a medida que aumenta la TLE hasta un máximo de alrededor de 100 keV/ μm y disminuye para valores más altos de TLE (figura 3). ¿De qué modo afecta la tasa de dosis a la producción de alteraciones citogenéticas? A los efectos de este documento es más fácil referirse a los dicéntricos, pero los principios se aplican igualmente a los micronúcleos y las traslocaciones. Es sabido que las lesiones inducidas en el ADN que pueden dar lugar a dicéntricos son reparables, proceso que tarda desde unos pocos minutos hasta varias horas, según la lesión concreta de que se trate. Si las dos lesiones necesarias para inducir un dicéntrico son consecuencia de trayectorias distintas, y si disminuye la tasa de dosis, es posible que la lesión producida por la primera trayectoria haya sido reparada antes de que la diana sea atravesada por una segunda trayectoria y se produzca una segunda lesión. Aunque se han producido dos lesiones dentro de la diana, no pueden interactuar y formar un dicéntrico. La probabilidad de que dos lesiones puedan interactuar disminuirá a medida que disminuye la tasa de dosis, siendo más baja la frecuencia de trayectorias ionizantes por unidad de tiempo cuando disminuye la tasa de dosis, con lo que aumenta el tiempo disponible para que la primera lesión sea reparada antes de que

se produzca la segunda. La situación para las radiaciones de baja TLE es, pues, la siguiente: al disminuir la tasa de dosis disminuye la frecuencia de dicéntricos por dosis unitaria. La curva de dosis-respuesta para dicéntricos a tasas de dosis muy bajas, cuando la probabilidad de que se produzcan aberraciones de dos trayectorias es prácticamente nula, será lineal, y la pendiente será igual a la de la porción lineal de la curva lineal cuadrática para exposiciones agudas. Ese mismo argumento es válido para las dosis fraccionadas. Si se reciben dos o más dosis, las lesiones producidas por la primera pueden interactuar con las causadas por la segunda dosis, o dosis ulteriores, siempre y cuando el tiempo transcurrido entre la primera dosis y la fracción de dosis subsiguiente no supere el tiempo necesario para reparar las lesiones inducidas por la primera dosis, o la dosis precedente. Por consiguiente, si las dosis están separadas por intervalos de tiempo suficientemente largos para que las lesiones se reparen entre las distintas fracciones de dosis, la frecuencia de dicéntricos producidos por la dosis total (la suma de las fracciones) será inferior a la de la dosis total impartida en una sola vez.

La situación puede diferir en lo que se refiere a la radiación de alta TLE, porque las dos lesiones que participan en la inducción de dicéntricos son resultado de una sola trayectoria. De ese modo, la disminución de la tasa de dosis no altera la frecuencia de dicéntricos, puesto que la reparación de las lesiones durante las exposiciones más prolongadas no tiene influencia. El mismo argumento es válido para las exposiciones fraccionadas; la reparación de las lesiones entre las fracciones no influye en gran medida, puesto que las dos lesiones se producen simultáneamente en una misma trayectoria.

Los aspectos examinados en esta sección señalan factores que deberían ser objeto de consideración en la práctica de la dosimetría biológica. En la forma de la curva de dosis-respuesta influye la calidad de la radiación (TLE). Por consiguiente, al calcular la dosis habría que utilizar una curva estándar correspondiente a una calidad de radiación igual, o muy similar, al tipo de radiación en particular que se haya dado en la emergencia. Se trata de un requisito importante, porque existen diferencias demostrables en la EBR correspondientes a lesiones cromosómicas inducidas para radiaciones de diversas TLE incluso si a efectos de protección radiológica se ponderan de forma idéntica ($W_R = 1$) [19]. Para radiaciones de baja TLE, al disminuir la razón de dosis también disminuye la frecuencia de dicéntricos por unidad de dosis, de tal modo que para razones de dosis muy bajas la curva es lineal y coincide con el componente lineal de la curva de dosis-respuesta de las exposiciones agudas. Se puede obtener una curva lineal a partir de una curva aguda estándar de rayos X y/o γ , y posiblemente se pueda utilizar como curva estándar para exposiciones crónicas, introduciendo las correcciones apropiadas para tener en cuenta la duración de la exposición y el tiempo de vida de los linfocitos. Para radiaciones de alta TLE, los cambios de la tasa de dosis no afectan a la frecuencia de dicéntricos, de modo que la curva obtenida para las exposiciones agudas se puede utilizar para las exposiciones crónicas o fraccionadas, también aquí teniendo en cuenta la duración de la exposición y los tiempos de vida de los linfocitos periféricos.

4. LINFOCITOS HUMANOS

Los linfocitos periféricos humanos forman una población de células que se encuentran predominantemente en la fase del ciclo celular previa a la de síntesis de ADN (es decir, fase G_0). Solo un 0,2 % o menos de los linfocitos periféricos se encuentran en el ciclo celular autosintético, y probablemente estos procedan del grupo de grandes células linfoides correspondientes a los linfocitos estimulados o células plasmáticas inmaduras. Las células de ese grupo podrían producir las infrecuentes mitosis que ocasionalmente se observan en la sangre periférica.

Nowell [20] mostró por primera vez que se puede estimular a los “leucocitos humanos” periféricos a sufrir mitosis *in vitro* mediante la fitohemaglutinina (PHA), una proteína que se obtiene del frijol común, mientras que Carstairs [21] mostró que los “linfocitos pequeños” eran las células diana de la iniciación mitogénica con la PHA.

Observados en frotis de sangre, los pequeños linfocitos periféricos presentan núcleos grandes y densos, rodeados de un citoplasma relativamente escaso (figuras 4 y 5). Tienen un diámetro de alrededor de $6\ \mu\text{m}$ y un volumen estimado en alrededor de $110\ \mu\text{m}^3$.

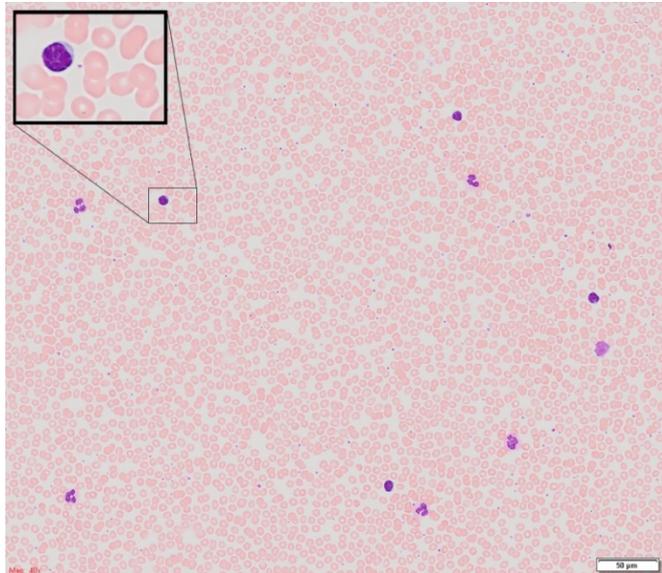


Fig. 4. Frotis sanguíneo típico en el que se muestran ampliados un linfocito y varios hematíes.

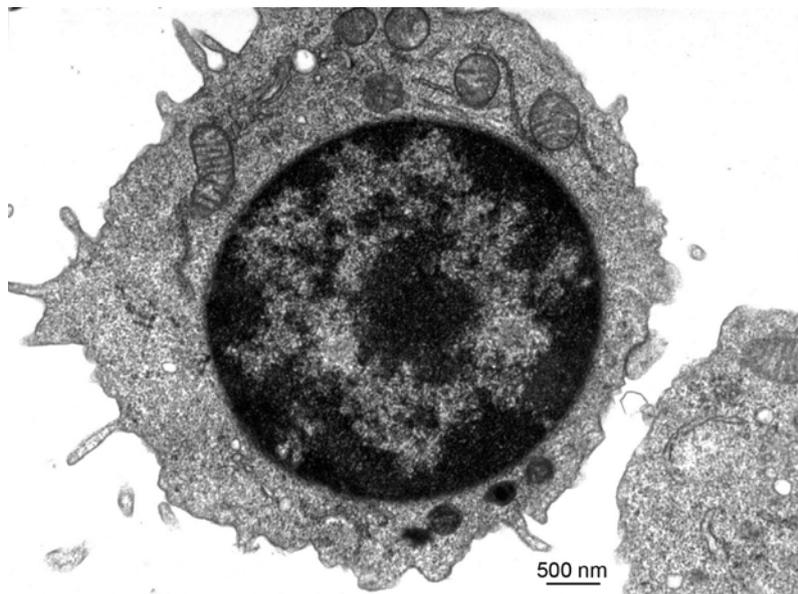


Fig. 5. Linfocito observado al microscopio electrónico.

Se distinguen dos tipos principales de linfocitos, a saber, las células T y las B. Los dos tipos proceden de células del saco vitelino que carecen de competencia inmunitaria y acaban depositándose en la médula ósea. Esas células madre no diferenciadas emigran al timo y otros órganos linfoides primarios, se multiplican en ellos, sufren mutaciones somáticas y dan lugar a un conjunto de linfocitos de larga vida que pasan a la circulación. En función de sus marcadores de superficie, las células T y B abarcan una mezcla de células no sensibilizadas y células de memoria, que tienen vidas de distinta duración y desempeñan distintas funciones en los procesos inmunológicos [22]. Son las células T, en su mayoría los subtipos CD4⁺ y CD8⁺, las que se estimulan *in vitro* con fitohemaglutinina y se utilizan en dosimetría biológica.

La concentración linfocitaria de la sangre periférica varía en función de la edad, origen étnico, presencia de patógenos y factores ambientales (por ejemplo, tabaquismo, obesidad, consumo de alcohol, etc.). Así, las poblaciones de determinados orígenes étnicos (por ejemplo, las del África oriental) presentan valores de base de recuento de linfocitos más bajos que la población general de referencia. Con la edad se observa una tendencia a que disminuya el valor del recuento de linfocitos. Ese es el caso particularmente durante la niñez, cuando se observa una disminución continua hasta aproximadamente $2 \times 10^9 / L$ a la edad de 15 años. La tendencia a la baja se observa asimismo entre los adultos, pero la disminución es más lenta y a los 75 años o más el recuento de linfocitos es inferior a $2 \times 10^9 / L$ [23].

En general, para un adulto sano, el margen normal de concentraciones leucocitarias en la sangre periférica es de $1,5$ a $4,0 \times 10^9 / L$ [24]. Sin embargo, en el caso de las irradiaciones con dosis altas de unos pocos Gy a una gran parte del cuerpo, una de las reacciones deterministas tempranas es la caída rápida del recuento linfocitario de la sangre periférica. Habría que tener presentes esos factores y obtener pronto muestras de sangre de las víctimas de radiaciones biológicas para someterlas a dosimetría biológica [25].

El número total de linfocitos de un joven adulto sano se estima en aproximadamente 500×10^9 . Solo alrededor del 2 % (10×10^9) de ellos se encuentra en la sangre periférica; los demás suelen estar en otros tejidos, en particular se concentran en el timo, los nódulos linfáticos, las amígdalas, los tejidos linfáticos de los intestinos, el bazo y la médula ósea. La duración de la vida de los linfocitos es variable, y la definición de ese período puede referirse a que la célula muere o que se divide. Las células T de los subtipos CD4⁺ y CD8⁺ se pueden dividir a su vez en subconjuntos, en función de las diferentes isoformas del antígeno CD45 que se expresen. En el momento del nacimiento, más del 90 % de las células T expresan la isoforma CD45RA; se trata de células que no están aún sensibilizadas. A la edad adulta la proporción se ha reducido a alrededor del 50 %, por conversión a un subconjunto CD45RO de células sensibilizadas, o de memoria.

Las lesiones cromosómicas inducidas por la radioterapia han sido objeto de estudio en células T de las formas RA y RO estimuladas con PHA [26]. La persistencia de lesiones inestables ha mostrado que las células RA no sensibilizadas se dividen en promedio una vez cada 3,5 años, mientras que las células de memoria RO se dividen más a menudo, en promedio cada 22 semanas. Asimismo, las células de memoria pueden regresar al fenotipo no sensibilizado, pero solo después de haber formado parte de la clase de memoria durante alrededor de 3,5 años, en promedio.

Para interpretar las aberraciones cromosómicas inducidas *in vivo* en el ser humano es muy importante que el grueso de los linfocitos periféricos pertenezca al 'grupo de redistribución'. Es decir, los linfocitos deberían poder salir de la sangre periférica, atravesar el bazo, los nódulos linfáticos y otros tejidos y regresar a la circulación. El tiempo medio que un linfocito del grupo de redistribución pasa en la sangre periférica es de alrededor de 30 minutos. Se ha calculado que alrededor del 80 %, es decir, 400×10^9 linfocitos, forman parte del grupo de redistribución y que el tiempo global de recirculación es de alrededor de 12 horas.

Eso significa que los linfocitos con aberraciones cromosómicas, cualquiera que sea la parte del cuerpo donde se hayan inducido, acabarán encontrándose en la sangre periférica. Por consiguiente, el sistema de pruebas de los linfocitos humanos no solo detecta las aberraciones cromosómicas inducidas en los linfocitos de la propia sangre periférica sino también las inducidas en linfocitos distribuidos en diferentes órganos del cuerpo [27].

La mayoría de los linfocitos periféricos se encuentran en la fase “de reposo” del ciclo celular (G_0) y su contenido de ADN diploide es de alrededor de 5,6 pg. Se puede inducir esas células a que empiecen a realizar divisiones mitóticas *in vitro* introduciéndoles fitohemaglutinina (PHA). La PHA es un mitógeno de carácter extremadamente general, que estimula a una gama muy amplia de células T. Bajo la influencia de la PHA, los linfocitos se transforman en células blastoides, aumentando el volumen del núcleo y del conjunto de las células. Cuarenta y ocho horas después de la estimulación, los linfocitos periféricos presentan un volumen celular de alrededor de $500 \mu\text{m}^3$, cuando antes de la estimulación era de unas $110 \mu\text{m}^3$. Los volúmenes citoplasmáticos son de $\sim 50 \mu\text{m}^3$ antes y $\sim 350 \mu\text{m}^3$ después de la estimulación. Con la estimulación, el volumen nuclear aumenta de $\sim 50 \mu\text{m}^3$ a $170 \mu\text{m}^3$.

La progresión del ciclo celular de los linfocitos después de la estimulación con PHA puede variar mucho en función de las condiciones de cultivo, por ejemplo según si se utilizan medios de cultivo tales como el F-10 de Ham, RPMI (Roswell Park Memorial Institute, RPMI-1640), medio TC-199, o medio de cultivo esencial mínimo (MEM). Por ejemplo, en el medio F-10 de Ham, la síntesis de ADN empieza alrededor de 26 horas después del inicio del cultivo y las primeras mitosis se registran unas 10 horas después. Se observan dos máximos de síntesis de ADN, medidos con tratamiento con timidina tritiada, uno a las 34 horas y un segundo a las 40 horas, y dos máximos de actividad mitótica, uno hacia las 44 horas y un segundo hacia las 49 horas. Ello podría corresponder a la existencia dos subpoblaciones de células que mostraran pautas de estimulación distintas en un cultivo a base de F-10 de Ham y PHA [28]. Sin embargo, en los linfocitos cultivados en medio TC-199, las interfases marcadas con tritio, así como los índices mitóticos, siguen una pauta irregular, lo que dificulta la extracción de conclusiones acerca de la posible existencia de subpoblaciones.

5. ESTRUCTURA DE LOS CROMOSOMAS

5.1. EMPAQUETAMIENTO DE LA CROMATINA

Se conocen considerablemente bien los detalles de la asociación del ADN y las histonas en el nucleosoma, pero no se conoce plenamente la asociación de las proteínas no histónicas con el conjunto nucleosómico. En todo caso, no cabe duda de que el ADN se encuentra en el exterior del núcleo de histonas del nucleosoma. Algunos estudios respaldan la existencia de una estructura central axial integrada por proteínas no histónicas o un armazón de proteína no histónica [29, 30] en el cromosoma metafásico. No se ha desentrañado aún la participación de esas estructuras centrales en la formación de las aberraciones cromosómicas. Las estructuras centrales también se detectan al microscopio óptico en forma de regiones susceptibles de tinción argéntica en los cromosomas que se encuentran en diferentes fases mitóticas. Aunque está bien documentada la existencia de una matriz de proteína nuclear organizada en la interfase, la presencia de un armazón en los cromosomas metafásicos es probablemente un artefacto. En la figura 6 se muestra un modelo de la organización de un cromosoma metafásico.

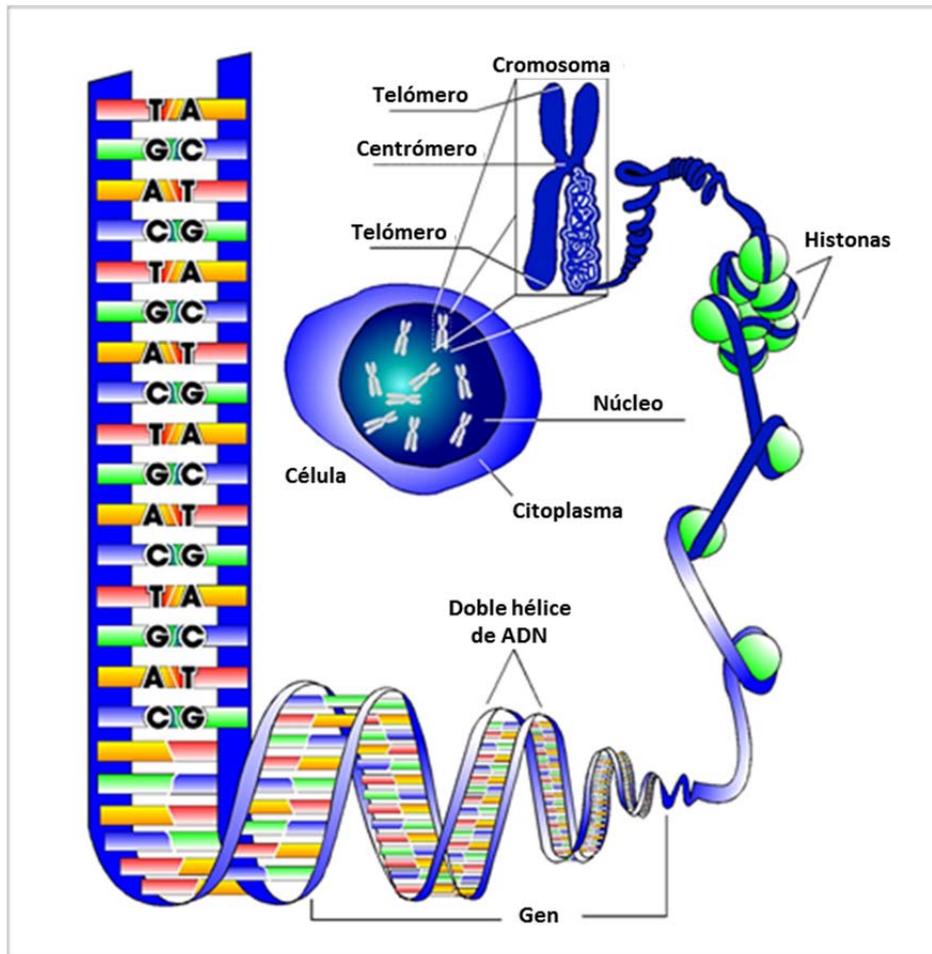
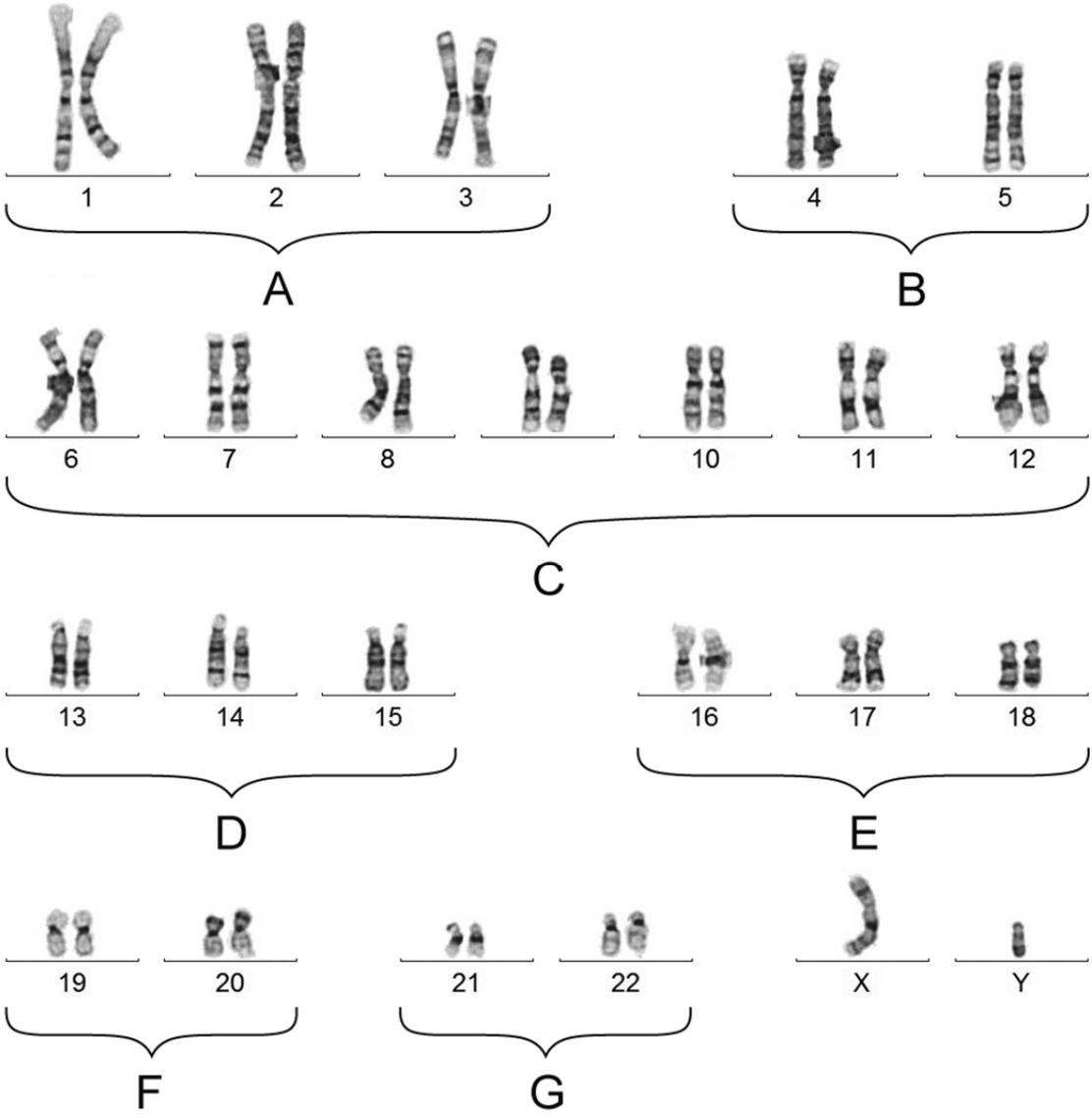


Fig. 6. Ilustración esquemática de los numerosos niveles de empaquetamiento de la cromatina que dan lugar a la elevada condensación de los cromosomas metafásicos (cortesía de REAC/TS, EE.UU).

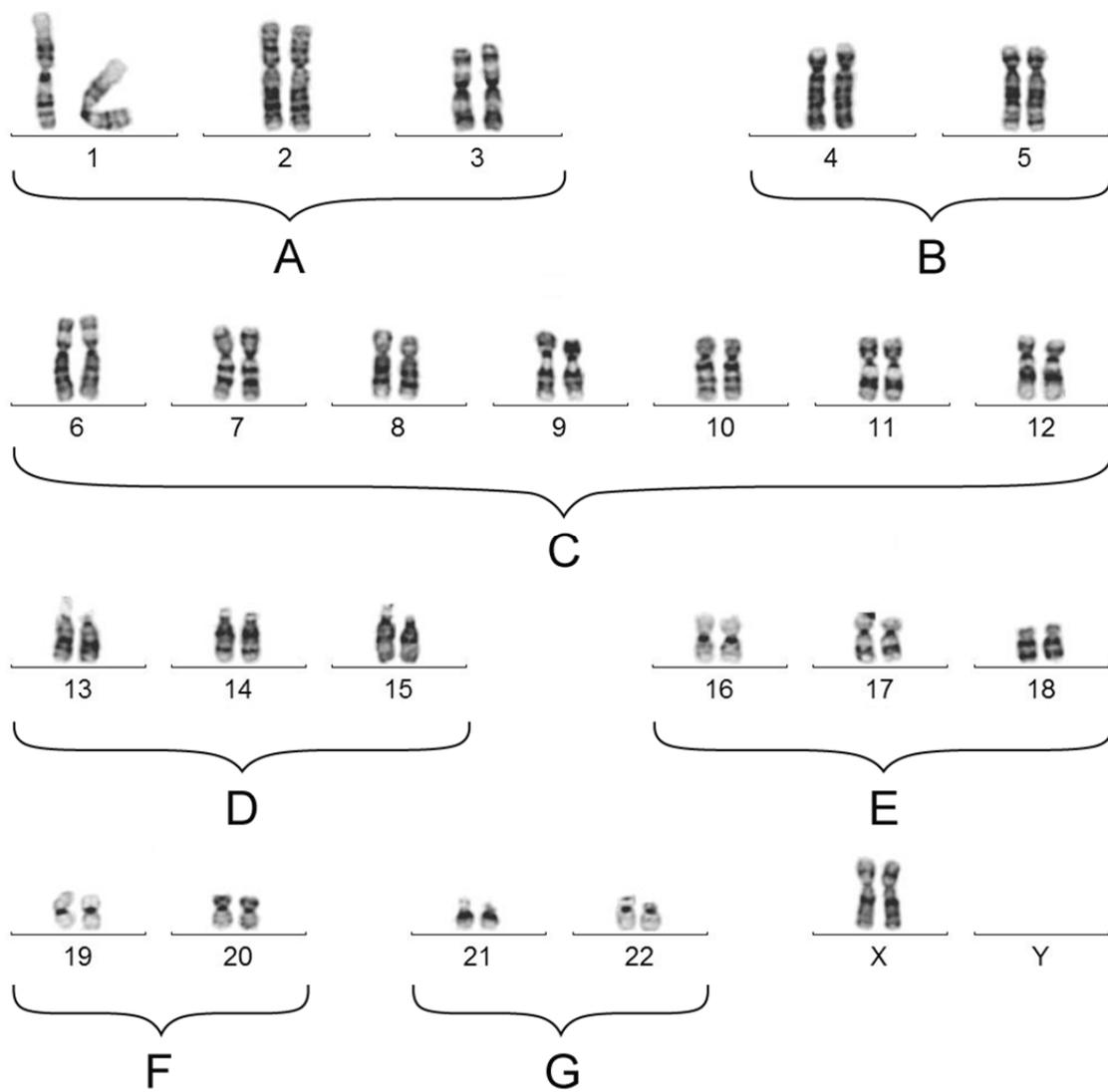
5.2. CARIOTIPO HUMANO Y CONTENIDO DE ADN DE LOS CROMOSOMAS

El cariotipo humano (figura 7) es la dotación cromosómica característica del ser humano, integrada por 23 pares de grandes cromosomas lineales de distintos tamaños, que dan un total de 46 cromosomas en todas las células diploides. Ordinariamente, los

cromosomas humanos se reúnen en siete grupos, de A a G, más una pareja de cromosomas sexuales, X e Y [31]. Los grupos de cromosomas son: A: 1-3, B: 4 y 5, C: 6 -12, D: 13-15, E: 16-18, F: 19 y 20 y G: 21 y 22.



Hombre



Mujer

Fig. 7. Preparación que muestra los cromosomas teñidos (cariotipo) de un hombre normal, 46, XY, y una mujer normal, 46, XX (cortesía de la Clínica Mayo, EE.UU.).

En los cuadros 2 y 3 se muestra el contenido relativo de ADN de los cromosomas humanos para los dos sexos. Los datos se han calculado a partir de Morton, 1991 [32].

CUADRO 2. PORCENTAJE DEL ADN DEL GENOMA DE UN HOMBRE QUE CORRESPONDE A CADA PAR DE AUTOSOMAS Y DE CROMOSOMAS SEXUALES

Cromosoma N°	Brazo p	Brazo q	Los dos brazos	Cromosoma N°	Brazo p	Brazo q	Los dos brazos
1	4,03	4,25	8,28	13	0,50	3,09	3,59
2	3,12	4,92	8,04	14	0,50	2,93	3,43
3	3,12	3,62	6,74	15	0,54	2,80	3,34
4	1,76	4,63	6,39	16	1,23	1,86	3,09
5	1,64	4,47	6,11	17	0,88	2,02	2,90
6	2,05	3,72	5,77	18	0,63	2,05	2,68
7	2,05	3,34	5,39	19	0,94	1,17	2,11
8	1,57	3,31	4,88	20	0,98	1,29	2,27
9	1,61	2,96	4,57	21	0,35	1,23	1,58
10	1,38	3,15	4,53	22	0,41	1,35	1,76
11	1,83	2,71	4,54	X	0,97	1,61	2,58
12	1,23	3,27	4,50	Y	0,20	0,73	0,93
						Total	100

CUADRO 3. PORCENTAJE DEL ADN DEL GENOMA DE UNA MUJER QUE CORRESPONDE A CADA PAR DE AUTOSOMAS Y DE CROMOSOMAS SEXUALES

Cromosoma N°	Brazo p	Brazo q	Los dos brazos	Cromosoma N°	Brazo p	Brazo q	Los dos brazos
1	3,97	4,18	8,15	13	0,49	3,04	3,53
2	3,07	4,83	7,90	14	0,50	2,88	3,38
3	3,07	3,56	6,63	15	0,53	2,76	3,29
4	1,74	4,55	6,29	16	1,21	1,83	3,04
5	1,61	4,40	6,01	17	0,87	1,98	2,85
6	2,02	3,66	5,68	18	0,62	2,01	2,63
7	2,01	3,29	5,30	19	0,93	1,15	2,08
8	1,55	3,25	4,80	20	0,96	1,27	2,23
9	1,58	2,91	4,49	21	0,34	1,21	1,55
10	1,36	3,10	4,46	22	0,40	1,34	1,74
11	1,80	2,66	4,46	X	1,92	3,16	5,08
12	1,21	3,22	4,43			Total	100

5.3. CICLO CELULAR

Examinando los cromosomas en el momento en que se inicia la división celular, que en las células somáticas es la mitosis, se puede obtener información importante sobre los efectos clastógenos de los agentes físicos y químicos sobre las células en interfase. El ciclo celular cuenta con cierto número de fases, que se distinguen por su apariencia y su función (figura 8).

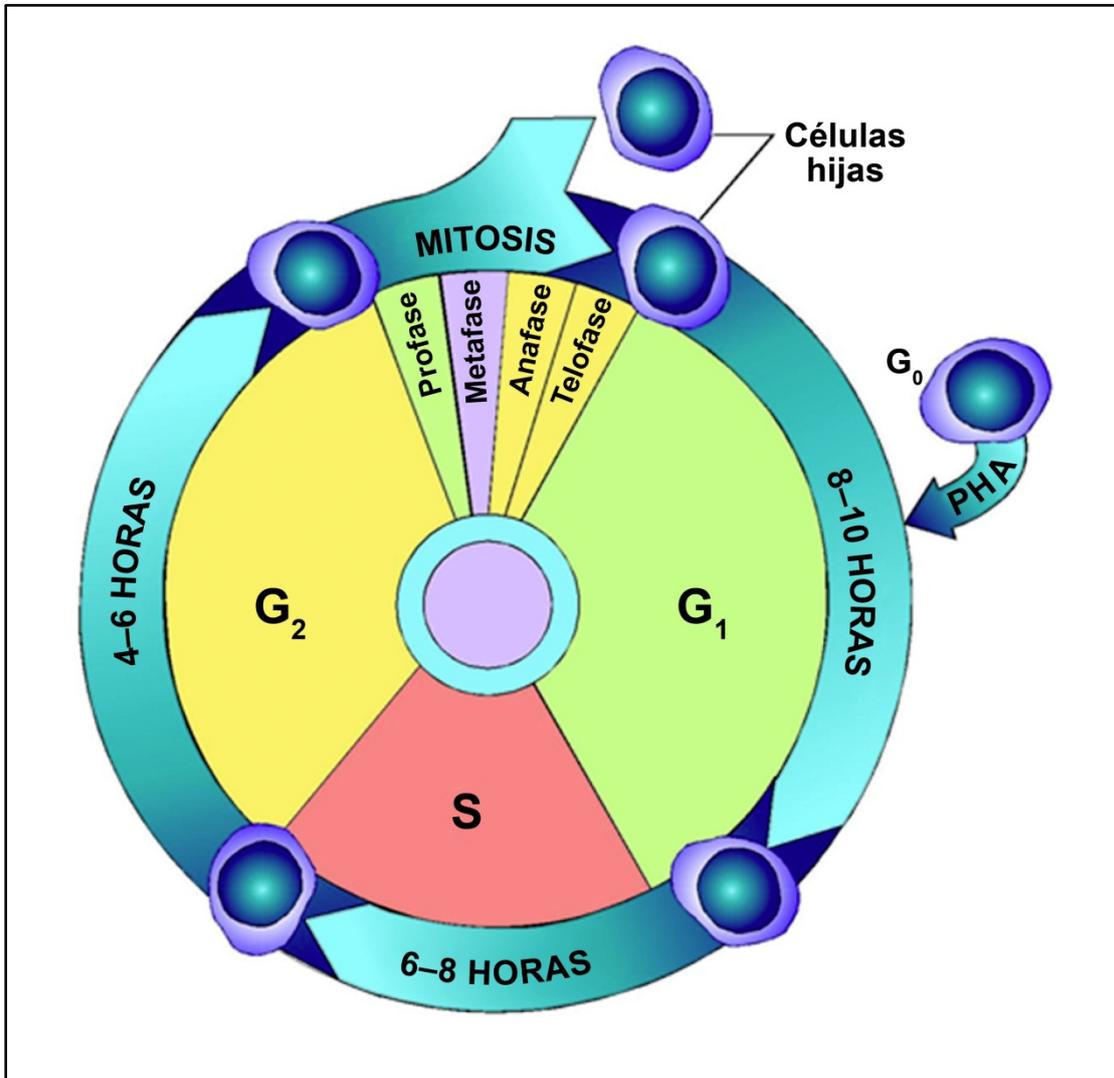


Fig. 8. Ciclo celular (cortesía de REAC/TS, EE.UU.).

En la mitosis se distinguen las fases siguientes: profase, metafase, anafase y telofase. Durante la interfase, el material cromosómico (es decir, el ADN y las proteínas asociadas a él) se duplica. Se trata del período denominado "S" (de síntesis), que dentro de la interfase está precedido del período denominado G₁ (presintético) y seguido del G₂ (postsintético). En las células que no efectúan ciclos, por ejemplo, los linfocitos periféricos, la célula se mantiene en G₀.

En las células que sí efectúan ciclos, la interfase es la parte metabólicamente más activa del ciclo celular, y la mayor parte de las reacciones del núcleo que precisan energía tienen lugar en esa fase. La duración de cada una de las fases del ciclo varía en función del tipo de célula y de las condiciones de crecimiento. Se puede determinar la duración de las fases mediante precursores del ADN marcados radiactivamente tales como la timidina tritiada. En los linfocitos, el primer ciclo celular que sigue a la estimulación está casi sincronizado, por lo que esas células se prestan particularmente bien a los estudios radiobiológicos. Las células de

mamíferos cultivadas que realizan ciclos no están sincronizadas, obviamente, pero se pueden sincronizar valiéndose de varias técnicas. La sensibilidad a la acción de los productos químicos o las radiaciones difiere en las distintas fases del ciclo, y los tipos de aberraciones cromosómicas producidos dependen de la fase en que se aplique el tratamiento. [33]. Por consiguiente, en esos estudios es importante trabajar con poblaciones sincronizadas, o al menos tener una estimación de la proporción de células que se encuentran en las diferentes fases en el momento de aplicar el tratamiento.

La progresión a lo largo del ciclo celular se controla en diferentes puntos para garantizar con la máxima fidelidad la integridad del ADN y la segregación adecuada de las células hijas. Los principales puntos de control se sitúan al final de G_1 , antes de la replicación, al final de G_2 , antes de la mitosis, y en la transición de la metafase a la anafase, antes de la segregación de los cromosomas y la división de las células. En esos puntos de control se puede bloquear la progresión del ciclo celular si se advierte que se han producido daños en el ADN, la replicación es incompleta o el huso presenta una estructura anormal.

6. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS INDUCIDAS POR LA RADIACIÓN

Las primeras pruebas notificadas de que los rayos X pueden inducir aberraciones cromosómicas proceden de los estudios genéticos de Müller [34] con *Drosophila*. Fueron confirmadas por los estudios citológicos de Painter y Müller [35]. Posteriormente, Sax [36] elaboró la hipótesis de “primero la rotura” sobre el origen de las aberraciones cromosómicas inducidas por los rayos X, y más tarde Revell [37] propuso la hipótesis alternativa del intercambio. En esencia, Sax [36] propuso que las regiones cromosómicas dañadas se ponen en contacto después de haber sufrido roturas completas y que los extremos se desplazan y acaban combinándose y realizando intercambios. Por el contrario, Revell [37] propuso que en los puntos de lesión no se producen roturas completas sino que esos lugares son puntos inestables que pueden interactuar con puntos similares y realizar intercambios de forma emparejada. Existe una tercera posibilidad, presentada más tarde por Chadwick y Leenhouts [38], consistente en la interacción entre puntos lesionados y no lesionados en la que los puntos lesionados, en el sentido de Revell, pueden interactuar con un cromosoma no dañado y realizar un intercambio.

6.1. LESIONES DEL ADN INDUCIDAS POR LA RADIACIÓN

La radiación ionizante se caracteriza por la deposición de energía de forma discontinua (en forma de pulsos, manchas y trayectorias) en el tiempo y el espacio, que daña el ADN directa e indirectamente al crear especies reactivas, principalmente por radiólisis del agua [39]. Los estudios biofísicos de la estructura de las trayectorias muestran que la radiación de baja TLE puede producir racimos de ionizaciones de forma localizada a lo largo de la trayectoria de un electrón. La radiación de alta TLE produce un número algo mayor de ionizaciones, próximas entre sí [17] (figura 9A). La radiación ionizante induce una amplia gama de daños en el ADN, en particular daños en las bases (BD), roturas monocatenarias (SSB), puntos carentes de base (AS), entrecruzamientos entre el ADN y las proteínas (DPC), y roturas bicatenarias (DSB) (figura 9B).

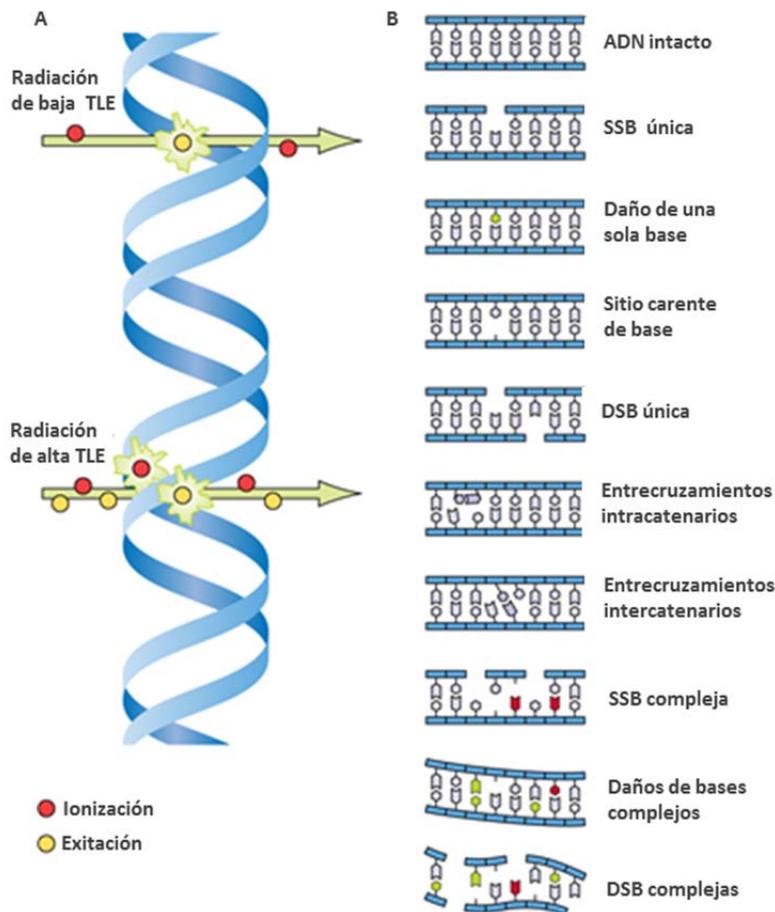


Fig. 9. Pauta de ionización de radiaciones de baja y alta TLE (A) y lesiones inducidas por la radiación (B) [40, 41].

La energía necesaria para formar una pareja de iones ($\text{H}_2\text{O}^+ + \text{e}^-$) a partir de la radiólisis del agua es de ~ 20 eV, y la radiación ionizante deposita la energía en eventos cuya gama de energías puede llegar hasta los centenares de eV, siendo la cantidad promedio de 60 eV. Dado que esa energía es suficiente para producir aproximadamente tres parejas de iones, los radicales formados reaccionarán en las inmediaciones de una región discreta y localizada. Las lesiones del ADN resultantes, para todos los tipos de radiación, pueden ser lesiones del ADN únicas con SSB, AS, o BD, lesiones múltiples en un mismo sitio (MDS) o lesiones del ADN arracimadas [42]. Las lesiones MDS producidas en el ADN pueden entrañar una o más DSB y varias SSB, así como BD. Las lesiones complejas y arracimadas del ADN pueden ser más difíciles de reparar, o puede que no sean reparables y por consiguiente quepa la posibilidad de que se produzcan aberraciones cromosómicas letales [43].

La célula dispone de complejos mecanismos de transducción de la señal, puntos de control del ciclo celular y vías de reparación para responder a la lesión del ADN. Las BD, AS y SSB se reparan mediante diversos procesos tales como la excisión de pares de bases (BER), excisión de nucleótidos (NER) y reparación de las roturas monocatenarias (SSBR) [44, 45]. Las DPC se reparan mediante NER y recombinaciones homólogas (HRR) [46]. Las DSB son lesiones críticas que, si se reparan incorrectamente, producen aberraciones cromosómicas tales como los dicéntricos o translocaciones [47]. Dos de los principales mecanismos de reparación de las DSB son la HRR y la unión de extremos no homólogos de ADN (NHEJ) [48, 49]. Los dos mecanismos actúan en fases diferentes del ciclo celular. Mientras que la

NHEJ interviene de forma importante en la reparación de las DSB en todas las fases del ciclo celular, la HRR lo hace moderadamente en la G_1 , aumentando su contribución a medida que la célula se adentra en el G_2 [50]. Sasaki [51] ha publicado una revisión exhaustiva de los procesos biofísicos y moleculares por los que las radiaciones provocan aberraciones cromosómicas.

6.2. ABERRACIONES DE TIPO CROMOSÓMICO

Se han presentado procedimientos para clasificar las aberraciones cromosómicas [52, 53].

Ordinariamente, la población de linfocitos periféricos sometidos a estimulación mitogénica no realiza ciclos celulares y se encuentra en la fase G_0 del ciclo celular. Las aberraciones cromosómicas inducidas por la radiación serán, por consiguiente, de tipo cromosómico, es decir, que en ellas participarán las dos cromátidas del cromosoma. Está bien establecido que la radiación ionizante es un clastógeno S-independiente, a diferencia de la radiación UV y los mutágenos químicos, que son agentes S-dependientes. Por consiguiente, la radiación ionizante induce aberraciones de tipo cromosómico y de tipo cromatídico tras el tratamiento de células G_0/G_1 y G_2/S , respectivamente. Sin embargo, los UV y los agentes químicos inducen mayoritariamente aberraciones cromatídicas en todas las fases del ciclo celular. Si se observan aberraciones de tipo cromatídico en células G_0/G_1 expuestas a radiaciones ionizantes se puede inferir que las aberraciones no han sido provocadas por la radiación o bien que las células ya han atravesado un segundo ciclo *in vitro*.

Por lo tanto, las aberraciones de tipo cromatídico no tienen mucho lugar en dosimetría biológica, porque no se inducen por irradiación de linfocitos G_0 . De todos modos, sí forman parte de la frecuencia de fondo general de lesiones cromosómicas y pueden presentarse en exceso si la persona objeto de investigación para determinar si ha estado expuesta a la radiación tiene antecedentes de exposición a clastógenos químicos. Es importante, por consiguiente, que quienes realicen los recuentos microscópicos estén plenamente familiarizados con las aberraciones de tipo cromatídicos y no las confundan con las de tipo cromosómico. Además, al aumentar el interés de las investigaciones sobre la inestabilidad cromosómica retrasada y los fenómenos conexos se ha renovado el interés por las aberraciones cromatídicas. De ahí que las aberraciones de tipo cromosómico se abarquen en esta sección y las aberraciones de tipo cromatídico en la sección 6.4.

6.2.1. Aberraciones inestables.

Dicéntricos

El dicéntrico (figura 10) es la principal aberración utilizada en dosimetría biológica.

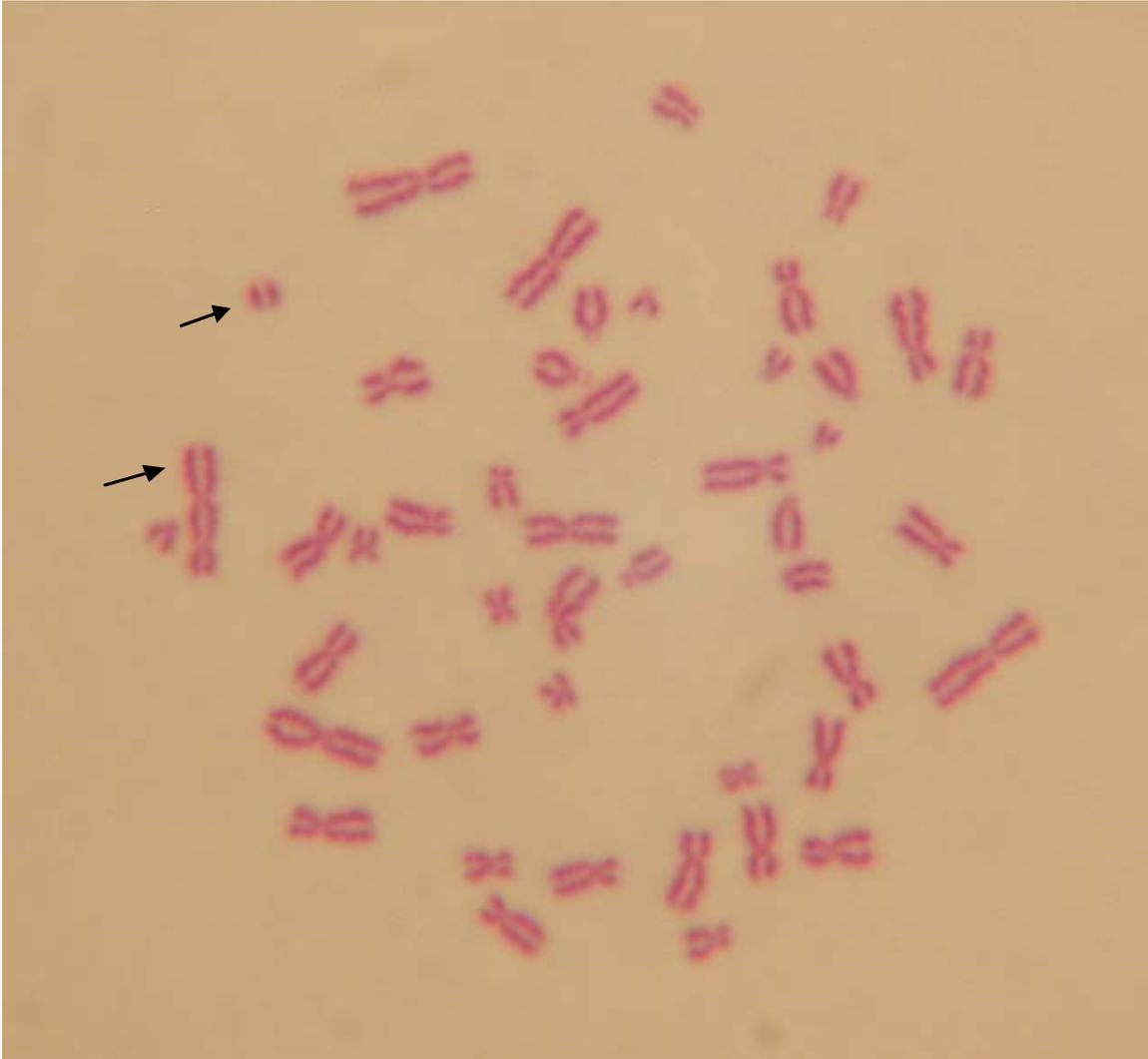


Fig. 10. Cromosoma dicéntrico junto con el fragmento acéntrico que lo acompaña (tinción de Giemsa).

Se trata de un intercambio entre las porciones centroméricas de dos cromosomas rotos, que en su forma completa va acompañado de un fragmento acéntrico formado por las porciones acéntricas de esos cromosomas. Se pueden formar configuraciones multicéntricas, en particular después de la irradiación con dosis altas. Los tricéntricos van acompañados de dos fragmentos, los tetracéntricos de tres, etc. La prueba de dicéntricos se abarca en detalle en la sección 9.

Anillos céntricos

En los linfocitos humanos, los anillos céntricos son mucho más escasos que los dicéntricos. Algunos investigadores los suman a los dicéntricos, mientras que otros prefieren no tenerlos en cuenta para estimar la dosis. El cromosoma anular resulta de un intercambio entre dos roturas localizadas en brazos distintos de un mismo cromosoma y también va acompañado de un fragmento acéntrico (figura 11).

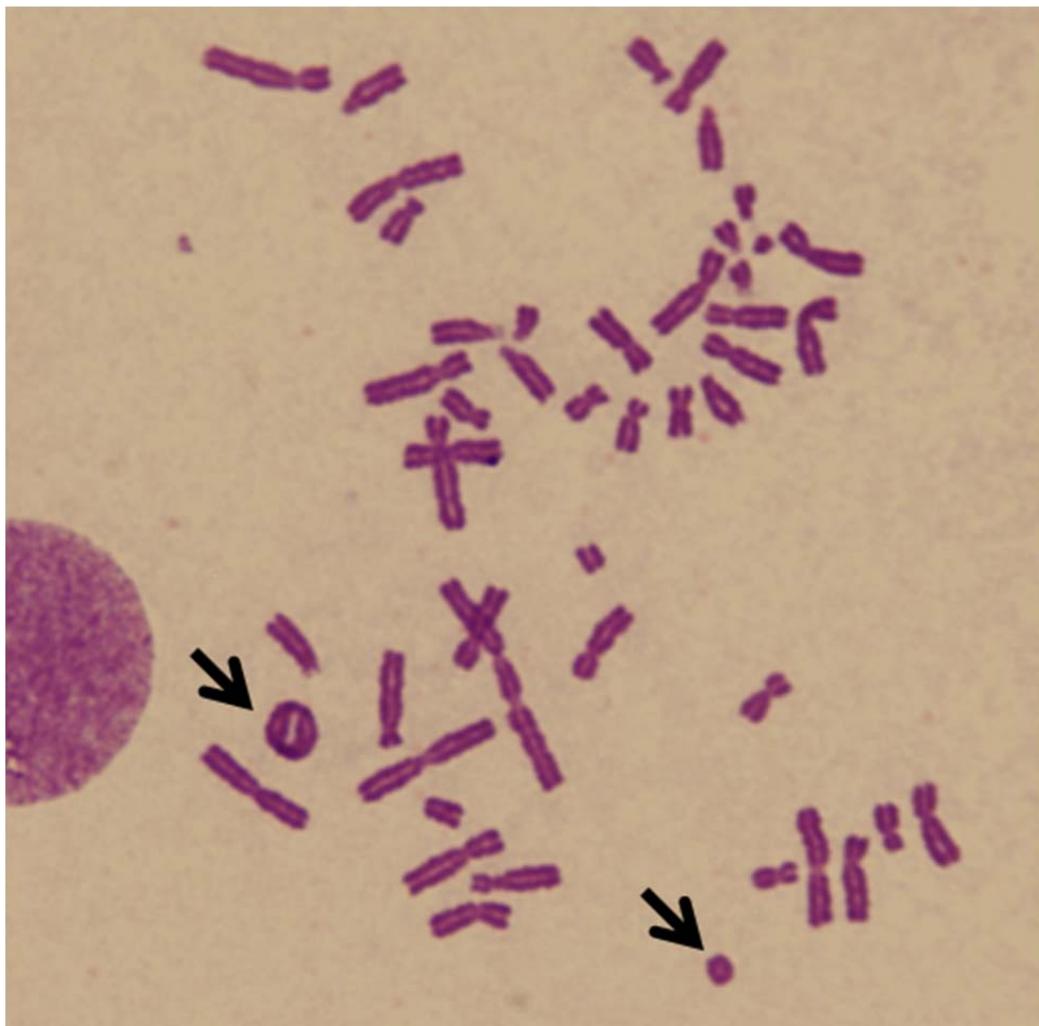


Fig. 11. Extensión metafásica con dos anillos (flechas), un dicéntrico y fragmentos acéntricos (tinción de Giemsa).

Acéntricos

Las aberraciones acéntricas se pueden formar independientemente de los intercambios descritos *supra*, razón por la cual usualmente se denominan acéntricos en exceso. Puede tratarse de deleciones terminales o intersticiales de diversos tamaños, pero no siempre se puede determinar su origen, razón por la cual se los considera conjuntamente. Los anillos acéntricos en los que se observan espacios claros en el interior de pequeñas estructuras circulares se consideran ordinariamente deleciones intersticiales, mientras que los minicromosomas, que aparecen como parejas de puntos de tinción uniforme, son en su mayoría deleciones terminales [54, 55].

Células malvadas

Se conocen como células malvadas las células metafásicas preparadas a partir de cultivos de linfocitos sanguíneos que presentan niveles extremadamente elevados de lesiones cromosómicas sin una causa aparente. En la figura 12 se muestra un ejemplo; las roturas y reordenaciones cromosómicas son tan amplias que cuesta identificar más de uno o dos cromosomas monocéntricos normales.

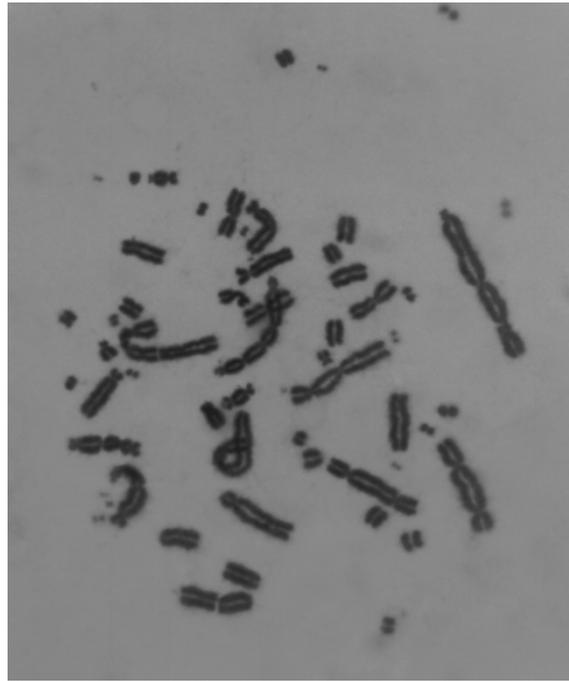


Fig. 12. Célula malvada observada entre otras 500 células metafásicas normales procedentes de una persona de control sana y no fumadora sin antecedentes de exposición ocupacional o médica a radiaciones y que habita en una zona con bajo nivel de radón. En la imagen metafásica se distinguen los rasgos característicos de una gran abundancia de cromosomas policéntricos y fragmentos acéntricos, incluido un gran número de minicromosomas.

Por el contrario, la célula presenta numerosos cromosomas policéntricos, fragmentos acéntricos y minicromosomas. Los minicromosomas son diminutos cuerpos de cromatina que contienen unas pocas megabases de ADN y que se pueden definir como los equivalentes citogenéticos de las secuencias de ADN amplificadas [56].

Estas células sin parangón se han observado en todas las razas y grupos étnicos del mundo entero. Por ejemplo, las células malvadas se observaron por primera vez en 1968 en muestras de sangre obtenidas de tribus de indios Yanomami, que habitan en la pluviselva de Venezuela [57]. Ulteriormente se han señalado en habitantes de muchos países, entre ellos Inglaterra, el Japón, Ucrania, Lituania y la Federación de Rusia. La expresión “células malvadas” fue acuñada por Awa y Neel [58], quienes describieron las células en la descendencia de sujetos de control, tanto irradiados como no irradiados, procedentes del bombardeo de Hiroshima. Análogamente a los estudios de los supervivientes de las bombas atómicas, las evaluaciones citogenéticas realizadas en poblaciones expuestas y no expuestas que vivían cerca de Chernóbil mostraron que las células malvadas no estaban asociadas a la exposición a radiaciones, puesto que se encontraban también en grupos de control no expuestos [59, 60].

Si bien se ha determinado incuestionablemente la presencia mundial de células malvadas en la población humana, se desconoce si tienen importancia clínica. En estudios en los que se obtienen muestras de forma seriada se ha constatado que las células malvadas son transitorias y aparecen intermitentemente en breves fogonazos y simultáneamente en determinados individuos de poblaciones delimitadas. Cabe señalar que no se ha señalado la presencia de células malvadas en la bibliografía citogenética clínica, lo que probablemente se deba a que los cultivos son más largos, de tres días, y se pueden producir de 2 a 3 divisiones celulares, con lo que las células malvadas probablemente se pierdan. Además, para diagnosticar si el cariotipo de la persona estudiada es normal o anormal, los citogenetistas analizan relativamente pocas células metafásicas (entre 15 y 20). Por el contrario, los citogenetistas radiológicos analizan

sistemáticamente centenares o incluso mil o más células metafásicas de la primera división procedentes de un mismo individuo, lo que aumenta enormemente la probabilidad de detectar células malvadas, que, como se sabe, se producen poco frecuentemente. En conclusión, la etiología y la importancia médica de las células malvadas de linfocitos humanos siguen siendo un enigma, si bien algunos datos apuntan a que algunos virus tales como el poliomavirus JC humano podrían intervenir en su expresión [61].

Habida cuenta de la existencia de células malvadas, se recomienda que, en la mayoría de los casos, a los efectos de la dosimetría biológica, las metafases aisladas que tengan aspecto de células malvadas se excluyan de la evaluación de la dosis. Una excepción a esa regla podría ser el caso en que se dispusiera de datos adicionales de exposición a radiaciones de alta TLE y que, en el caso ideal, se observaran varias células con daños múltiples que presentaran un espectro continuo de lesiones.

6.2.2. Aberraciones estables

Traslocaciones recíprocas

Se entiende por traslocación recíproca el intercambio de las porciones terminales de dos cromosomas distintos. Los diversos tipos de traslocaciones fueron descritos por primera vez utilizando la técnica de bandeado G y el cariotipado, pero el procedimiento es demasiado laborioso para la dosimetría biológica sistemática. Con la tinción de Giemsa, que es monocroma, las traslocaciones no se observan de modo tan fiable. Su aplicación en dosimetría es ahora posible con el método FISH (véase la sección 10), con el que se observan en forma de cromosomas monocéntricos bicolors (figura 13).

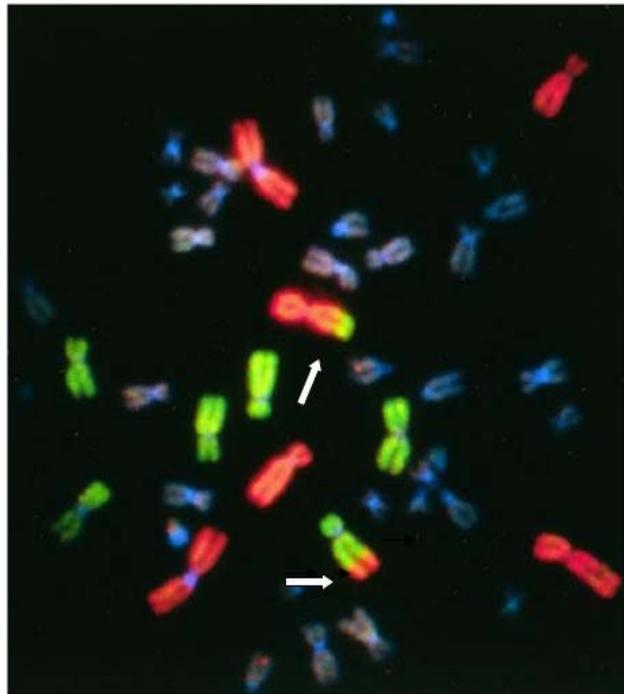


Fig. 13. Metafase en la que se ilustra la “pintura” de los cromosomas con el método FISH para detectar las traslocaciones. Las parejas de cromosomas 1, 2 y 4 se han “pintado” de rojo y las parejas 3, 5 y 6 de verde. La traslocación recíproca se manifiesta en los cromosomas bicolors (2 y 5), que han intercambiado segmentos en los extremos de sus brazos largos (cortesía de Ramsey y Tucker, LLNL, EE.UU.).

Traslocaciones no recíprocas

Cuando se observa un solo cromosoma bicolor, la traslocación a menudo se denomina terminal, o incompleta o unidireccional. Sin embargo, valiéndose de una combinación de sondas de cromosomas enteros, centrómeros y telómeros, se ha comprobado que cierto número de traslocaciones que se habían considerado terminales o incompletas en realidad son recíprocas. Es muy probable que la señal de la porción correspondiente que falta se encuentre por debajo del límite de resolución visual, por lo que se ha propuesto que esas traslocaciones, o intercambios, se denominen unidireccionales. En la actualidad se considera que sí existen traslocaciones terminales pero que suponen un pequeño porcentaje del total, por ejemplo, que a 4 Gy corresponden aproximadamente al 5 % [62].

Traslocaciones intersticiales (inserciones)

Se trata de un cromosoma bicolor en el que un fragmento acéntrico de un cromosoma se ha insertado en el brazo de otro cromosoma. En la figura 14 se muestra un ejemplo.

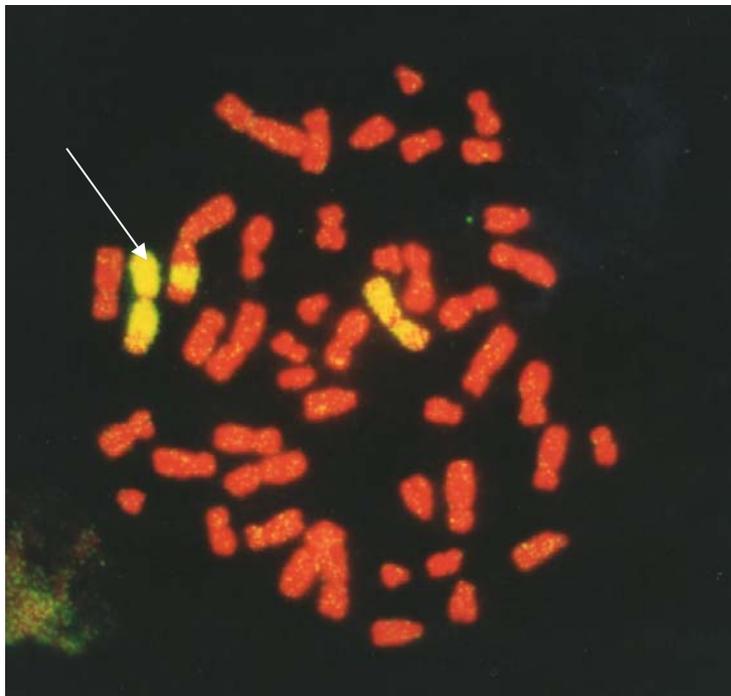


Fig. 14. Extensión de una metafase humana en la que se distingue una inserción. La pareja de cromosomas 1 se ha pintado de amarillo y todos los demás cromosomas se han contrateñido con yoduro de propidio.

Células estables e inestables

Es posible realizar dosimetrías biológicas con el método FISH con carácter retrospectivo, porque las aberraciones estables, tales como las traslocaciones recíprocas, atraviesan la mitosis y se transmiten a las células hijas. Sin embargo, para que ello ocurra es necesario que el genoma entero sea estable. Una traslocación no podrá superar la división si en la misma célula existe una estructura inestable no conexas, por ejemplo, un dicéntrico o un acéntrico en exceso. Ello ha llevado a que la estabilidad no se considere únicamente una característica de los distintos tipos de aberraciones sino de la célula en su conjunto. Así fue reconocido hace muchos años por Buckton *et al.* en 1967 [63], quien introdujo las designaciones de Cs y Cu para las células estables e inestables, respectivamente. La noción ha recuperado prominencia con el desarrollo de la dosimetría biológica retrospectiva con el método FISH, con la que se ha demostrado que las traslocaciones recíprocas (bidireccionales) parecen ser más estables que las incompletas (unidireccionales) [64, 65].

6.3. ABERRACIONES DE TIPO CROMATÍDICO

Las aberraciones de tipo cromatídico se suelen clasificar del mismo modo que las de tipo cromosómico; en las aberraciones de tipo cromatídico, la unidad que aparentemente participa es, en la mayoría de los casos, una sola cromátida, y no el cromosoma entero, como ocurre en las aberraciones de tipo cromosómico.

Deleciones terminales e intersticiales

Una deleción terminal es un desplazamiento bien definido del fragmento cromatídico situado en posición distal respecto de la lesión (figura 15).

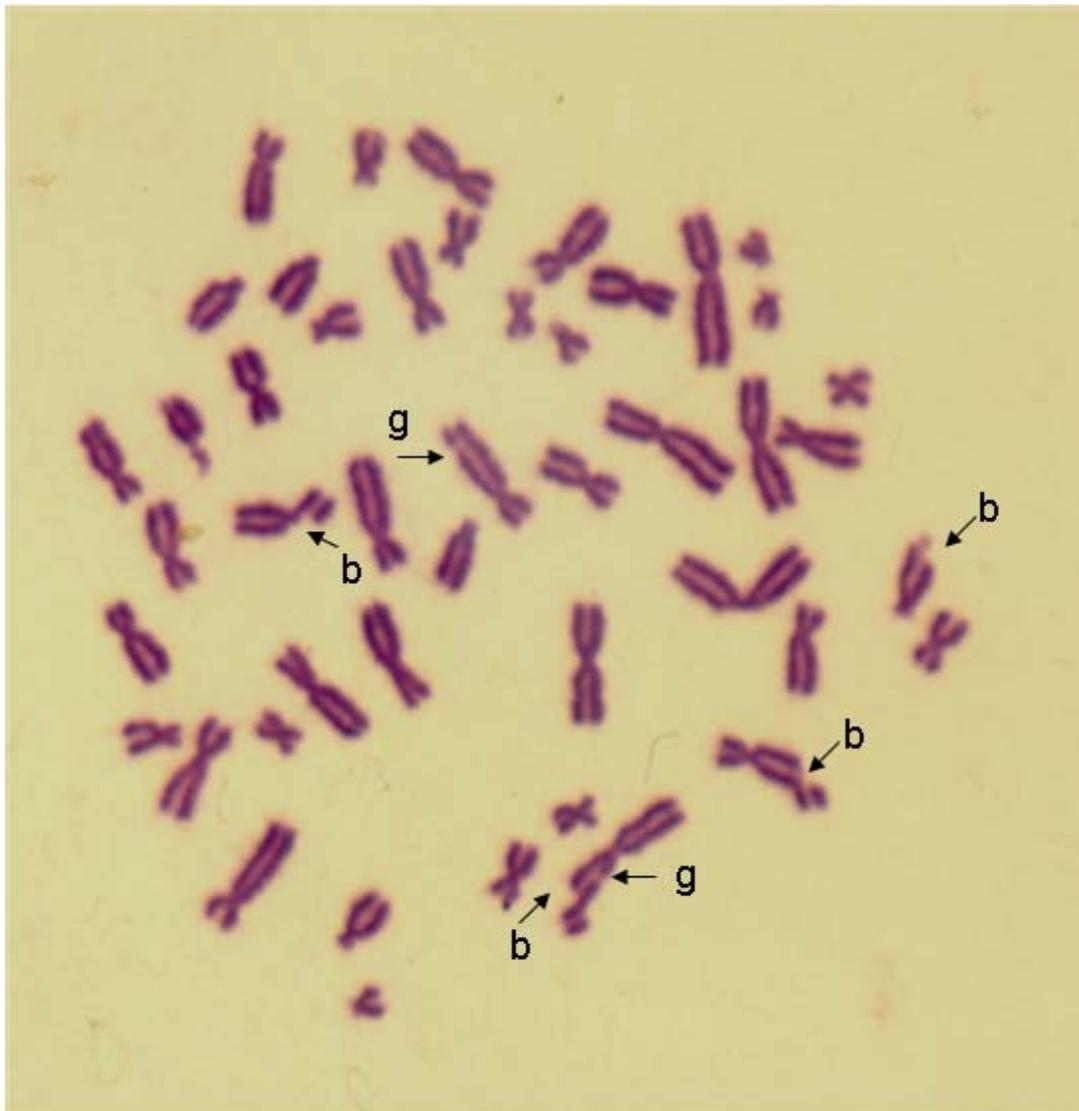


Fig. 15. Extensión metafásica con roturas (b) y huecos (g) cromatídicos.

Para que sea considerada una deleción terminal, la anchura de la región que no se tiñe situada entre las regiones céntrica y acéntrica tiene que ser mayor que la de la cromátida. Esta definición se utiliza para distinguir las deleciones terminales (roturas cromatídicas) de las lesiones acromáticas (huecos).

Las deleciones intersticiales de tipo cromatídico no se observan tan fácilmente como sus homólogas de tipo cromosómico, en parte porque el pequeño fragmento suprimido a menudo está separado del cromosoma que ha sufrido la deleción y no se observa.

Lesiones acromáticas

Las lesiones acromáticas (o huecos), figura 15, son regiones del cromosoma que no se tiñen, o se tiñen muy levemente, que se manifiestan en una sola cromátida (simples) o en las dos cromátidas, aparentemente en loci idénticos (dobles). Si la anchura de la región que no se tiñe es inferior a la de la cromátida, se considera que se trata de una lesión acromática. Manifiestamente, esta es únicamente una definición de trabajo. En general, se sugiere registrar las lesiones acromáticas, pero siempre separándolas de las deleciones cromatídicas. No se debería incluir su frecuencia en los totales de aberraciones por célula, puesto que en la actualidad no está clara su importancia ni su relación con otras aberraciones “genuinas”.

Deleciones isocromatídicas

Las deleciones isocromatídicas constituyen excepciones a la clase de aberraciones de tipo cromatídico en cuanto que en ellas participan las dos cromátidas, provocándose aparentemente “roturas” en la misma posición de ambas. Sin embargo, en un material adecuado se constata que se pueden inducir con radiaciones en las fases S y G₂ del ciclo celular, como ocurre en otras aberraciones de tipo cromatídico.

Se pueden dar varios tipos, en función de la naturaleza de las uniones entre las cromátidas hermanas que tengan lugar. Si se produce una unión entre las cromátidas hermanas, es posible distinguir las aberraciones isocromatídicas de las deleciones terminales de tipo cromosómico. Sin embargo, en las células de mamífero es muy poco frecuente que se produzcan uniones entre las cromátidas hermanas, y la mayoría de las deleciones isocromatídicas son de los tipos proximal y distal sin unión. La mayoría de las veces, el fragmento acéntrico no se asocia a la porción céntrica suprimida del cromosoma. Según la convención, puesto que las aberraciones inducidas por radiaciones en los linfocitos en fase G₀ son de tipo cromosómico, en el análisis todos los fragmentos acéntricos apareados se tienen que clasificar como deleciones terminales de tipo cromosómico. Dado que, en todo caso, la frecuencia de deleciones isocromatídicas será baja en los linfocitos, la convención no carece de sentido.

Intercambios asimétricos

Los intercambios asimétricos (intercambios entre brazos e intercambios cromatídicos asimétricos) son equivalentes cromatídicos de los dicéntricos de tipo cromosómico.

Intercambios simétricos

Los intercambios simétricos (intercambios cromatídicos simétricos), figura 16, son equivalentes cromatídicos de las traslocaciones recíprocas de tipo cromosómico.



Fig. 16. Extensión metafásica con un intercambio cromatídico asimétrico, teñida con Giemsa.

En el caso de los intercambios simétricos de tipo cromatídico, el apareamiento somático mantiene la asociación entre los cromosomas que participan en el intercambio, por lo que estos se pueden observar fácilmente sin aplicar procedimientos de bandeado.

Intercambios asimétricos y simétricos

Existen dos formas de intercambios simétricos y asimétricos entre brazos, pero cuando se analizan células metafásicas solo se distingue una de ellas. El apareamiento somático hace posible observar el intercambio simétrico.

Trirradiales

Un trirradial (configuración con tres brazos) se puede describir como la interacción entre un cromosoma que presenta una deleción isocromatídica y un segundo que presenta una deleción cromatídica.

A todas luces, la clasificación no es exhaustiva, puesto que se pueden producir muchos tipos de aberraciones complejas. Las descritas aquí son con mucho las que se observan más comúnmente. Savage [52] propone una clasificación más completa.

6.4. CONDENSACIÓN PREMATURA DE LOS CROMOSOMAS

Cuando las células entran en mitosis, la cromatina se condensa y forma las familiares configuraciones de los cromosomas. Se han elaborado técnicas que también provocan la condensación de la cromatina cuando no se encuentra en mitosis, lo que se denomina condensación prematura de los cromosomas (PCC). Se puede inducir la condensación prematura fusionando células interfásicas con células mitóticas de ovario de hámster chino (CHO) o células HeLa utilizando el virus de Sendai o macrogol (PEG) como agente de la fusión [66]. No obstante, la fusión con virus de Sendai obliga a utilizar células con membranas particularmente receptivas a las partículas víricas, y se ha notificado que los linfocitos en G_0 no se funden satisfactoriamente con el virus de Sendai. La dificultad se superó a efectos de la dosimetría biológica utilizando PEG para inducir la PCC [67].

Asimismo, se han elaborado métodos químicos para inducir la PCC utilizando inhibidores de la fosforilación del ADN tales como el ácido okadaico o la caliculina A. La mayoría de esos métodos requieren que las células se encuentren realizando ciclos *in vitro* [68, 69].

La técnica de la PCC, que se describe pormenorizadamente en la sección 11, es un instrumento de investigación muy útil para sondear los procesos inmediatamente posteriores a la irradiación y la cinética de la restitución y/o los fallos de la reparación de las roturas cromosómicas que provocan las aberraciones (es decir, los dicéntricos y las traslocaciones) [70–72]. Esos estudios demuestran que los dicéntricos, las traslocaciones completas o incompletas y los fragmentos acéntricos que en última instancia se observan en las metafases se forman en la fase G_0 en momentos distintos y dependen de la dosis. En los linfocitos humanos, a dosis bajas de rayos X (1–2 Gy) se forman rápidamente dicéntricos y traslocaciones. Sin embargo, a dosis más altas de 4 y 6 Gy las frecuencias de intercambios cromosómicos aumentan proporcionalmente a la restitución de las roturas cromosómicas (reparación).



Fig. 17. Condensación cromosómica prematura inducida por fusión mediante PEG en un linfocito humano no irradiado fusionado con una célula mitótica de ovario de hámster chino. Se observan 46 PCC de cromatina monotatenaria bien definidos.

6.4.1. Técnicas de PCC

Las distintas técnicas de PCC se pueden dividir del modo siguiente:

Prueba de PCC con fusión; es la primera que se describió en la bibliografía, en 1974 [73, 74]. En esta prueba, los linfocitos se fusionan con células mitóticas. A menudo se utilizan células CHO, con el fin de inducir la condensación prematura de los cromosomas humanos [67]. El planteamiento permite recontar el número de fragmentos de cromosoma humano y, de ese modo, el número de fragmentos cromosómicos que, por efectos de la radiación, exceden la frecuencia de fondo. Se ha utilizado también para obtener una estimación de la exposición no uniforme [75]. La ventaja principal de este método es que el daño se puede observar poco después de haber obtenido la muestra de sangre.

Con la *prueba rápida de cromosomas interfásicos (RICA)* se puede visualizar el daño inducido por la radiación utilizando sondas FISH. El ADN de los cromosomas se condensa artificialmente con el fin de identificar los dominios cromosómicos y detectar los intercambios entre dos dominios distintos [76–78].

La *prueba de dicéntricos con PCC* posibilita la observación de los dicéntricos en fases del ciclo celular distintas de la clásica fase M (principalmente en la fase G₂) y, de ese modo, la visualización de células que no se habrían observado con la prueba de dicéntricos convencional [79]. Ello es particularmente interesante cuando el recuento de linfocitos ha disminuido como consecuencia de una exposición y cuando es difícil obtener mitosis clásicas. Mediante el método de PCC con fusión se puede reducir el tiempo que separa la obtención de la muestra y la estimación de la dosis [79], si bien cuando se utilizan técnicas químicas para inducir la PCC la mayoría de los laboratorios realiza cultivos de 48 horas y, por consiguiente, el tiempo no disminuye.

La *prueba de anillos de PCC* corresponde a la visualización de anillos inducidos mediante radiaciones en células que se encuentran en diferentes fases del ciclo celular (figura 18).

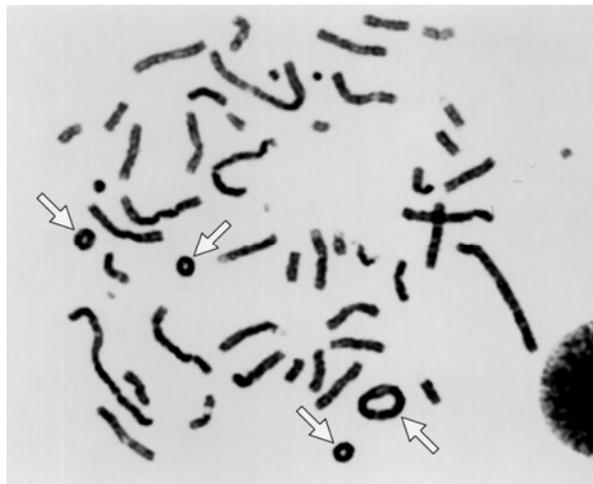


Fig. 18. Anillos de PCC (flechas) en un linfocito obtenido del paciente A del accidente de Tokai-mura (véase la sección 11.3).

La principal ventaja de este planteamiento es que se pueden medir dosis mucho más altas que con la prueba de dicéntricos clásica, puesto que la saturación del número de anillos se produce solo a dosis superiores a los 20 Gy para radiaciones de baja TLE [70, 80, 81].

6.5. MICRONÚCLEOS

Se forman micronúcleos (MN) cuando en la anafase se quedan rezagados fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros, que no pasan a los núcleos de las células hijas (figura 19A, B). Se manifiestan en el interior del citoplasma de las células hijas como pequeños objetos esféricos que presentan las mismas propiedades morfológicas y de tinción que los núcleos [82].

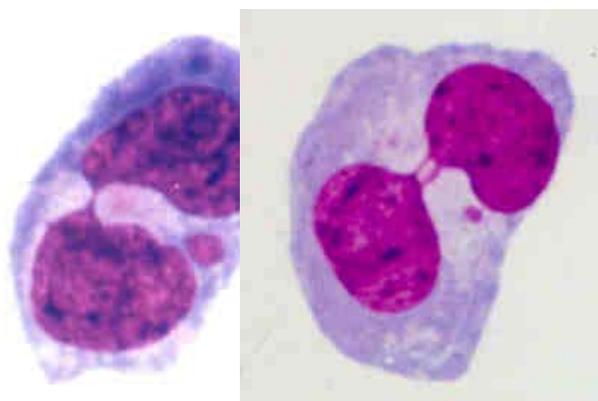
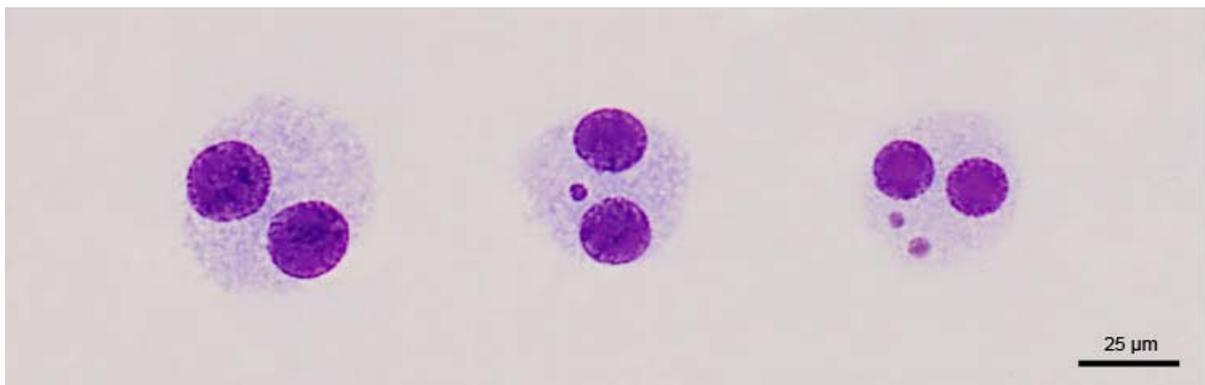
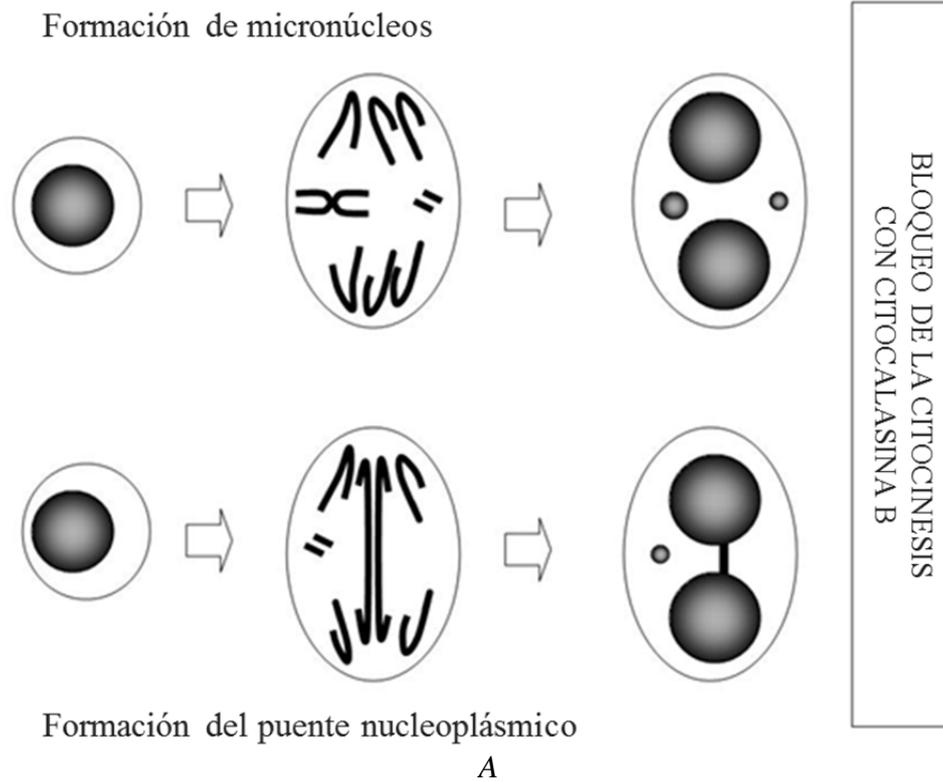


Fig. 19. (A) Diagrama esquemático del mecanismo de formación de micronúcleos y puentes nucleoplásmicos en la prueba de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis. (B) Ejemplos de células binucleadas sin micronúcleos y con uno o dos micronúcleos. (C) Ejemplos de células binucleadas con uno o dos puentes nucleoplásmicos; en todos los casos, el puente nucleoplásmico está acompañado de un micronúcleo.

A mediados de los años 1980 se introdujo una importante innovación técnica. Se trata de un método en el que, sin inhibir la división nuclear, se bloquea la citocinesis en linfocitos cultivados agregando citocalasina B (Cyt-B) al medio. El bloqueo de la citocinesis [83, 84] da lugar a la formación de células binucleadas (BN), pues no produce la separación de las dos células hijas. Con este protocolo es posible, por consiguiente, distinguir las células que proliferan (después de la primera mitosis) de las que no proliferan, y de recontar específicamente los MN en las células que son capaces de expresarlos, es decir, las células BN. La prueba modificada permite identificar y cuantificar los MN en células binucleadas que han conservado el citoplasma (figura 19B).

La medición de los micronúcleos en células BN se puede perfeccionar aún más utilizando sondas centroméricas que hacen posible distinguir los micronúcleos procedentes de fragmentos cromosómicos acéntricos de los que proceden de cromosomas enteros [85, 86].

Los adelantos registrados actualmente en la automatización de la detección de MN abren nuevas perspectivas al uso de la prueba en la evaluación de las víctimas en gran escala de exposiciones a radiaciones y en la biomonitorización sistemática [87] (sección 13.3.3).

La prueba de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis ha evolucionado ahora hasta convertirse también en una prueba del citoma en la que se puede evaluar una gama entera de lesiones cromosómicas, en particular roturas, reordenaciones cromosómicas asimétricas, pérdidas de cromosomas y no disyunciones, así como necrosis, apoptosis y citostasis [86]. Este método se utiliza asimismo específicamente para medir los puentes nucleoplásmicos (NPB) (figura. 19A, C), un biomarcador indirecto de los cromosomas dicéntricos originado por la fusión de extremos teloméricos o por el fallo de la reparación de las roturas de la doble cadena de ADN [86]. Por consiguiente, los NPB medidos en la prueba del citoma con bloqueo de la citocinesis se pueden aplicar también a la dosimetría biológica de la exposición a las radiaciones ionizantes [88]. Se ha observado también una fuerte correlación, y curvas de dosis-respuesta similares, entre los NPB y los cromosomas dicéntricos y los anillos céntricos [89].

En la sección 12 se proporciona información pormenorizada sobre el análisis de MN y la prueba del citoma.

7. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

7.1. SECUENCIA CRONOLÓGICA

Se podría obtener por venopunción una muestra de sangre, preferentemente de 10 mL, pocas horas después de producirse una exposición del cuerpo entero a la radiación. Sin embargo, si la exposición ha sido parcial o no uniforme, los linfocitos de los grupos circulantes y extravasculares no habrán alcanzado el equilibrio hasta pasadas alrededor de 24 horas [90]. Por consiguiente, dado que la muestra podría contener una proporción no representativa de células irradiadas, es aconsejable retrasar la toma de la muestra hasta el día siguiente, por lo menos. Habría que tratar de obtener la muestra con prontitud, puesto que incluso si los parámetros hematológicos del paciente están dentro de los límites normales al cabo de aproximadamente unas cuatro semanas, la cantidad de aberraciones empieza a disminuir y aumenta la incertidumbre de la estimación de la dosis de radiación [91].

Si se ha producido una sobreexposición grave y es probable que el recuento de leucocitos disminuya fuertemente, se dispone de solo unas pocas horas o días antes de que el recuento de linfocitos disminuya hasta el punto de que no se puedan obtener suficientes células para realizar el análisis citogenético. Si el tratamiento médico prevé la realización de transfusiones de sangre entera o de fracciones sanguíneas es importante obtener una muestra de sangre del paciente antes de que comience el tratamiento. Por interés científico, el laboratorio debería tratar de obtener una secuencia de muestras de sangre a intervalos frecuentes. Ello es éticamente aceptable puesto que el muestreo se realiza para monitorear las modificaciones del recuento de los distintos leucocitos.

Puede que no siempre se puedan obtener cultivos celulares con prontitud, por ejemplo, si las muestras se toman en regiones remotas mal comunicadas. Las muestras sanguíneas se pueden conservar refrigeradas, pero rápidamente se plantea la cuestión de la pérdida de viabilidad de los linfocitos [92]. El problema se supera estimulando los linfocitos con fitohemaglutinina (PHA) inmediatamente después de la venopunción y manteniéndolos en frío (por debajo de los 20 °C), de modo que no se transformen y avancen en el ciclo celular hasta que se calienten a 37 °C. El método siguiente, elaborado por M. S. Sasaki (comunicación personal) permite retrasar el cultivo celular hasta dos semanas:

- 1) Preparar por adelantado tubos estériles de 10 mL que contengan 5 mL de medio L-15 de Leibovitz con un 20 % de suero bovino fetal y un 4 % de PHA deshidratada (el medio L-15 de Leibovitz es esencial para el transporte a largo plazo porque está tamponado con una cantidad 10 veces mayor de aminoácidos que otros medios de cultivo comunes y el pH se mantiene estable durante mucho tiempo).
- 2) Tomar una muestra de sangre en un tubo heparinizado convencional.
- 3) Agregar 5 mL de sangre heparinizada en un tubo con medio L-15 y mezclar.
- 4) Mantener los tubos en frío (<20 °C); en estas condiciones, se pueden almacenar o mandar al laboratorio sin que disminuya significativamente la viabilidad.
- 5) Seguidamente, las células se lavan con un medio convencional y se procesan siguiendo los pasos descritos en la sección 9.1 para el establecimiento de cultivos convencionales.

Si se utiliza el procedimiento del medio de Leibovitz será necesario validarlo con una curva de dosis-respuesta obtenida en las mismas condiciones.

7.2. ANTICOAGULANTE

El anticoagulante más utilizado para el cultivo de linfocitos es la heparina de litio exenta de conservantes, aunque se puede utilizar heparina de sodio o de amonio. Con otros

anticoagulantes comunes, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), a menudo el crecimiento celular no es bueno, por lo que no se deberían utilizar. Si se recibe una muestra con un anticoagulante no adecuado es preferible pedir una muestra nueva. Sin embargo, ello no siempre es posible y en esos casos se puede “rescatar” la muestra lavándola. El procedimiento consiste en tomar 4 mL de la sangre, agregar 6 mL de una solución salina equilibrada (de Hank o de Earle) o un medio de cultivo y centrifugar a 600g durante 3 a 5 min. Retirar el sobrenadante y agregar 10 mL de líquido de lavado al sedimento de células y centrifugar de nuevo. Una vez retirado el sobrenadante final, se pueden devolver las células lavadas al volumen de sangre original agregando medio de cultivo que contenga un 10 % de suero de ternera fetal. Seguidamente se pueden establecer los cultivos según se describe en la sección 9.1, tratando la muestra lavada como si fuera una muestra sanguínea ordinaria.

7.3. CONTENEDORES

Varias empresas fabrican tubos desechables de vidrio o plástico para muestras con las cantidades correctas de heparina de litio. Se pueden utilizar tanto los antiguos tubos de tapón de rosca como los tubos de vacío. Tienen que estar estériles, y muchos fabricantes los suministran sistemáticamente estériles, pero hay que confirmar que lo estén. Hay que evitar los tubos que contengan geles o microesferas de vidrio o plástico. Si se utiliza heparina liofilizada es importante mezclar la sangre adecuadamente invirtiendo el tubo varias veces. Es preferible que el laboratorio de citogenética proporcione el tubo de muestra de su reserva propia. De ese modo, además, se podrán dar instrucciones detalladas al médico y se podrá indicar en el paquete la dirección correcta a la que se deberá devolver la muestra.

7.4. TRANSPORTE

Es preferible que durante el transporte las muestras de sangre se conserven entre 18°C y 24 °C. Si se prevé que deberán soportar temperaturas muy alejadas de ese margen se aconseja utilizar refrigerantes o envoltorios que mantengan la temperatura ambiente, así como dispositivos de registro de la temperatura. En todo caso, hay que evitar que las muestras se congelen durante el transporte.

El transporte de las muestras debe cumplir la reglamentación nacional y/o internacional pertinente sobre transporte de sustancias infecciosas, según se expone en la guía de la OMS sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas [93]. En ese documento se explica asimismo a los remitentes el modo de clasificar, documentar, marcar, etiquetar y empaquetar las sustancias infecciosas o potencialmente infecciosas tales como las muestras de sangre para diagnóstico.

Se pueden utilizar tubos estándar de vidrio o plástico de heparina de litio. Hay que disponerlos en un contenedor secundario rígido, indeformable y estanco. En el contenedor debería haber también material de acolchado y material absorbente en cantidad suficiente para absorber la totalidad del contenido, pero no debería haber bolsas refrigerantes. El contenedor secundario tiene que disponerse en un envoltorio externo, es decir, en una caja de cartón resistente, debidamente etiquetado. Los envíos de muestras de sangre con fines diagnósticos sobre los que no consta que contienen patógenos se clasifican como “UN 3373. SUSTANCIA BIOLÓGICA, CATEGORÍA B”. Por consiguiente, en el etiquetado deberá figurar esa frase, junto con un rombo equiángulo de fondo blanco que lleve escrito en caracteres negros ‘UN 3373’. Además, en el paquete hay que indicar el nombre del remitente, su dirección y número de teléfono, el nombre del destinatario, su dirección y número de teléfono, y el número de teléfono de una persona responsable que esté informada del envío [93].

Si se considera necesario incluir elementos de refrigeración o de mantenimiento de la temperatura ambiente, hay que disponerlos por fuera del contenedor secundario, y el envase

externo tiene que ser de material aislante, por ejemplo de poliestireno. En el comercio se encuentran envases que se ajustan a la reglamentación.

En los envíos internacionales, el remitente tiene que obtener los permisos de exportación o importación que corresponda, y hay que notificar el envío de las muestras al laboratorio de destino, para que, en caso necesario, tramite la autorización de importación. A menudo resulta práctico recurrir a una empresa de mensajería que preste un servicio rápido “de puerta a puerta” y se ocupe de los trámites aduaneros, etc.

Son tolerables los plazos de tránsito de dos o tres días; sin embargo, las muestras de sangre precisan servicios de entrega especiales para evitar retrasos prolongados, por ejemplo, por causa de festividades nacionales.

En los transportes aéreos, la sangre no se debe irradiar con rayos X en los controles de seguridad. Si es probable que eso vaya a ocurrir, en el paquete se puede incluir un trozo de película de rayos X o un dosímetro estándar de termoluminiscencia (TLD) o un dispositivo de monitoreo de luminiscencia estimulada ópticamente (OSL). En el paquete debe figurar la indicación “NO IRRADIAR CON RAYOS X”, advertencia que se tiene que incluir también en la documentación que acompañe al envío.

8. OBTENCIÓN *IN VITRO* DE UNA CURVA DE DOSIS-RESPUESTA

8.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Pese a la mejora de las técnicas y a que en el análisis de los datos se utilizan programas de estadística más comparables, sigue habiendo diferencias en las curvas de calibración entre laboratorios. La interpretación de la dosis sirviéndose de una curva obtenida en otro lugar puede aumentar la incertidumbre, razón por la cual hay que recomendar que todo laboratorio que vaya a realizar dosimetrías biológicas determine sus propios datos de dosis-respuesta [94].

En la mayoría de las sobreexposiciones accidentales intervienen fuentes de radiación gamma, pero se registra también un número apreciable de sucesos con rayos X. Se ha determinado fehacientemente que la calibración de esas dos radiaciones de baja TLE es distinta, en particular a dosis bajas. Por consiguiente, todo laboratorio que decida establecer un programa de dosimetría biológica tendrá que determinar en primer lugar las curvas de dosis-respuesta de esas cualidades de radiación. Afortunadamente, los sucesos que entrañan la exposición a neutrones son infrecuentes, pero se debería considerar la posibilidad de que el laboratorio deba responder ante un accidente de criticidad. En ese caso, se precisará una curva de calibración para los neutrones del espectro de fisión.

Se deberán irradiar linfocitos *in vitro* aproximándose todo lo posible a la situación *in vivo*; de ese modo se obtiene la misma relación dosis-respuesta [95]. Hay que utilizar muestras frescas de sangre, en tubos de heparina de litio, que se irradian como la sangre entera a 37 °C. Después de la irradiación se conservan 2 horas más a 37°C y seguidamente se cultivan aplicando un método estándar idéntico al que se utilice para la prueba de los dicéntricos, las traslocaciones o los micronúcleos con las muestras obtenidas de los pacientes supuestamente sobreexpuestos.

8.2. CONSIDERACIONES FÍSICAS

La preparación de la curva de dosis-respuesta tiene que estar respaldada por una dosimetría física fiable y exacta, por lo que es necesario considerar un cierto número de aspectos. La sangre se tiene que colocar de modo tal que la dosis se pueda deducir fácilmente, y hay que exponerla a una distancia suficiente de la fuente para que la irradiación se pueda considerar uniforme. Por ejemplo, si la muestra tiene un grosor de 1 cm, se tiene que situar por lo menos a 1 m de la fuente, para que la diferencia entre la parte delantera y la parte trasera de la dosis sea inferior al 2 %. Para que las partículas cargadas estén en equilibrio, la sangre tiene que estar rodeada de una cantidad suficiente de material. Para rayos gamma de ^{60}Co bastará un material de densidad equivalente a 4 mm de agua; para rayos X de 250 kVp solo es necesario 1 mm. Para los neutrones suele bastar también 1 mm.

Hay que reducir al mínimo posible el material aledaño, para evitar las complicaciones debidas a la dispersión de la radiación. El material debería tener una composición atómica similar a la de la sangre, porque la dosis impartida a la sangre cerca de la pared del contenedor de la muestra se deberá a electrones procedentes de interacciones con la pared. Si la composición atómica es muy distinta, las células serán irradiadas de forma no uniforme. Para los rayos X y los rayos γ , la densidad de electrones es el principal factor a tener en cuenta al considerar la diferencia de composición, mientras que en el caso de los neutrones importan los constituyentes atómicos, porque los neutrones interactúan con los núcleos de los átomos de la diana.

Es necesario calibrar el montaje de exposición con medidas físicas, y lo más común es que se utilice una cámara de ionización, pero se pueden aplicar otros métodos. Por ejemplo, en la figura 20 se ilustran mediciones realizadas con alanina.



Fig. 20. Gradilla de exposición utilizada para sostener y posicionar tubos de ensayo de 15 mL y tubos al vacío de 10 mL para exposiciones a irradiación con fuentes de rayos γ . El contenedor de la gradilla es de plexiglás, y se ha diseñado con paredes de 6 mm de grosor para asegurar que las partículas cargadas estén en equilibrio. Asimismo, el contenedor dispone de orificios de acceso en sus extremos, para que se pueda conectar un baño María circulante (que no se muestra) que mantenga el contenido a 37 °C durante la irradiación. Se muestran también los tubos de ensayo y los tubos al vacío, ya sea con agua o con viales de alanina, utilizados para las mediciones dosimétricas [97] (cortesía de AFRRI, EE.UU.).

El detector del dosímetro físico debe estar rodeado de material equivalente al que rodea la sangre. De ser posible, debe tener las mismas dimensiones que la muestra de sangre, para que pueda sustituir a la muestra a efectos de la dosimetría. Ordinariamente, el dosímetro físico se calibrará en kerma en aire, en unidades de Gy, y debería ser trazable respecto de una norma nacional. El factor de conversión a Gy en tejido blando es la razón de los coeficientes másicos de absorción de energía. El valor numérico se obtiene multiplicando el valor del kerma en aire por un factor de 1,09 para rayos X de 250 kVp y de 1,10 para rayos γ de ^{60}Co . Por consiguiente, el factor depende de la energía y disminuye a medida que disminuye la energía. Existe también una diferencia entre los factores de conversión para los tejidos blandos y para la sangre, pero para radiaciones de baja TLE es suficientemente pequeña para que se pueda despreciar. Para los neutrones puede que se aproxime al 5 %. El factor de calibración comprende la absorción por la pared de la cámara de ionización, pero a menudo será necesario corregir la tasa de dosis para tener en cuenta la absorción por la propia sangre.

El método usual para determinar las dosis consiste en convertir el kerma en aire medido en dosis absorbida en el tejido o la sangre y a continuación introducir las conversiones necesarias para tener en cuenta la distancia (ley de la inversa de los cuadrados), la absorción y la diferencia de composición del material en la interfase con la sangre. El tamaño y la geometría general del aparato son resultado de un compromiso entre esos factores, porque cuanto menor es la muestra de sangre, menor es la corrección debida a la absorción y mayor la corrección debida a la diferencia de composición. En todo caso, la geometría y el material se tienen que elegir de modo que se reduzca al mínimo la necesidad de introducir correcciones.

Para obtener *in vitro* una curva de calibración aplicable a los casos de exposición accidental aguda, la tasa de dosis debe elegirse de tal modo que todas las dosis se impartan en menos de 15 min. De ese modo, las diferencias de tiempo de aplicación de las distintas dosis serán suficientemente pequeñas para que la influencia sobre el coeficiente β , el coeficiente del cuadrado de la dosis de la producción, no sea superior a aproximadamente un 4 %. Además, algunos investigadores prefieren obtener calibraciones no agudas para comprender mejor la modificación que se debería introducir en el coeficiente β para interpretar la producción de aberraciones en accidentes en los que se producen irradiaciones prolongadas. Más importante

aún es que esas calibraciones se realicen a 37°C. Si se realizan a temperatura ambiente serán escasas o nulas las reparaciones que se lleven a cabo durante la exposición, con lo que la curva de dosis-respuesta resultante será la misma que para las irradiaciones agudas. Es importante recordar que el tiempo de exposición, y no la tasa de dosis, es el factor crítico en la calibración prolongada. Por consiguiente, todos los puntos de datos deben obtenerse de sangre que se haya irradiado durante el mismo tiempo, lo que se puede lograr modificando la distancia a la fuente, y ello, obviamente, requiere que se efectúen bastantes más mediciones de calibración. La alternativa más sencilla, utilizando una tasa de dosis constante y, por consiguiente, una sola posición de irradiación, obliga a utilizar distintos tiempos de aplicación para cada dosis, con lo que los datos resultantes no se corresponderán tan bien con la ecuación lineal cuadrática de dosis-respuesta. [96].

A efectos de calibración, algunos laboratorios prefieren colocar la muestra de sangre en un “maniquí”, considerando que así se tiene en cuenta en cierta medida la dispersión en el cuerpo humano (figuras 20 y 21).

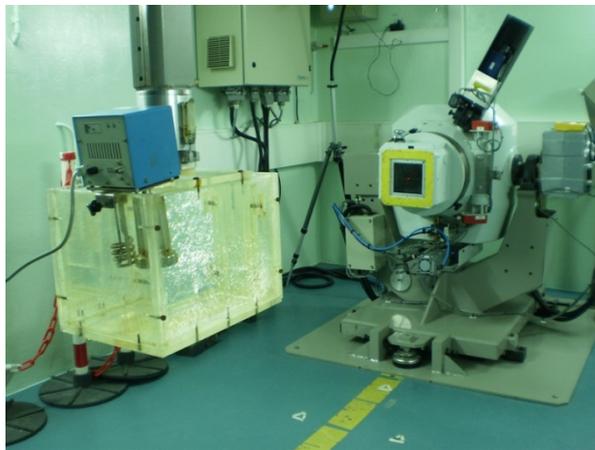


Fig. 21. Baño María calentado a 37°C situado delante de una fuente de rayos gamma de cobalto 60. Para lograr el equilibrio electrónico, la muestra de sangre se coloca en el interior de un soporte de plexiglás.

Sin embargo, hay que tener más en cuenta los mencionados factores de corrección dosimétrica y la posibilidad de colocar una cámara de ionización junto a la muestra de sangre. A modo de “maniquí”, para simular el cuerpo se suele utilizar agua, que se ha de mantener a 37 °C. Si la cámara de ionización se coloca con la misma disposición geométrica que la muestra de sangre, se tendrá en cuenta la dosis debida a la dispersión de la radiación. El uso de agua caliente obliga a introducir importantes correcciones de temperatura y presión y, por supuesto, la cámara no se puede mojar. Resultan particularmente problemáticas las calibraciones de neutrones realizadas con “maniquí”. En lugar de agua es preferible utilizar un material equivalente al tejido. De ese modo se produce un espectro de radiación parecido al del cuerpo y, posiblemente, un reforzamiento considerable del componente de baja TLE de la dosis impartida a los linfocitos. Especificar el espectro de los componentes de la dosis total absorbida puede resultar muy difícil.

8.3. CONSIDERACIONES ESTADÍSTICAS

Como se examinó en la sección 3, se dispone de datos muy sólidos de que la producción de aberraciones cromosómicas o micronúcleos (Y) se relaciona con la dosis (D) por medio de la ecuación lineal cuadrática

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (3)$$

o bien, para la radiación de alta TLE, el término α aumenta y, en última instancia, el término β pierde importancia biológica y asimismo queda “enmascarado” estadísticamente, de modo que la relación dosis-respuesta se aproxima a la ecuación lineal

$$Y = C + \alpha D \quad (4)$$

El objetivo del ajuste de la curva es determinar los valores de los coeficientes C, α y β que mejor se ajusten a los puntos de datos. Para los dicéntricos, la irradiación con rayos X o gamma produce una distribución del daño que se representa muy bien con la distribución de Poisson [98]. Por el contrario, los neutrones u otros tipos de radiación de alta TLE producen distribuciones que muestran una sobredispersión, en la que la varianza (σ^2) supera a la media (y). Sigue abierta la cuestión de si la razón entre la varianza y la media (σ^2/y) es una función de la dosis. En el caso de los micronúcleos, los datos tienden hacia la sobredispersión a todas las dosis, incluso si se irradian fotones.

Dado que los métodos de ajuste de la curva se basan en modelos estadísticos de Poisson, se debería verificar si la distribución de células dicéntricas se ajusta a una distribución de Poisson para cada dosis utilizada en la determinación de la curva de calibración. En la actualidad, la prueba utilizada más frecuentemente es la de la u [99, 100]. El estadístico de la prueba de la u es una unidad normalizada del índice de dispersión (σ^2/y), que para una distribución de Poisson debería valer 1. Los valores de u superiores a 1,96 indican una sobredispersión (con un nivel de significación bilateral de $\alpha = 0,025$).

$$u = (\sigma^2/y - 1) \sqrt{\frac{N - 1}{2(1 - 1/X)}} \quad (5)$$

donde:

N indica el número de células analizadas, y

X el número de dicéntricos (o dicéntricos y anillos) detectados.

Los valores de $u < -1,96$ indican una subdispersión. Desde una perspectiva biológica es muy poco probable que se produzca una subdispersión, por lo que los valores de u inferiores a -1,96 podrían indicar que ha habido un problema en la obtención de las muestras.

Para que el ajuste de la curva sea adecuado se precisa un número suficiente de grados de libertad, para reducir al mínimo el error de la curva. Lo ideal es que se utilicen 10 o más dosis en el margen de 0,25–5,0 Gy. Para radiaciones de baja TLE no es necesario disponer de datos superiores a aproximadamente 5,0 Gy y, en efecto, hay pruebas de que más allá de esa dosis se satura la producción de aberraciones, lo que provoca una distorsión del coeficiente β [101]. Para radiaciones de alta TLE se sugiere un máximo de 2,0 Gy.

Dado que en la mayoría de los accidentes radiológicos intervienen dosis inferiores a 1,0 Gy, el extremo inferior de la curva es particularmente importante para estimar la dosis. Por consiguiente, hay que tratar sobre todo de reducir la incertidumbre estadística asociada al coeficiente de producción α . Se sugiere que varias de las dosis de calibración, en todo caso por lo menos cuatro, se sitúen en el margen de 0,25 a 1,0 Gy. Si el laboratorio tiene capacidad

para obtener datos sobre dosis inferiores a 0,25 Gy, es muy deseable que los obtenga. A dosis superiores, hay que tratar de detectar 100 dicéntricos por dosis. Sin embargo, a dosis inferiores es muy difícil lograrlo, y en su lugar se deberían examinar varios miles de células por punto; se propone entre 3 000 y 5 000 células. En todos los casos, el número de células examinadas debe depender del número de puntos de dosis de la zona de dosis bajas, centrándose en la reducción al mínimo del error de la curva de ajuste. En el cuadro 4 se dan ejemplos de datos utilizados para obtener las curvas de dosis-efecto para radiación γ de baja TLE y radiación α de alta TLE.

CUADRO 4. RESULTADOS CITOGENÉTICOS OBTENIDOS CON MUESTRAS DE SANGRE IRRADIADAS CON RAYOS γ Y PARTÍCULAS DE HELIO-4 [102, 103]

Rayos γ (cobalto 60)												
Dosis (Gy)	N	X	Distribución celular de dicéntricos						σ^2/y	u		
			0	1	2	3	4	5			6	
0,000	5 000	8	4 992	8							1,00	-0,07
0,100	5 002	14	4 988	14							1,00	-0,13
0,250	2 008	22	1 987	20	1						1,08	2,61
0,500	2 002	55	1 947	55							0,97	-0,86
0,750	1 832	100	1 736	92	4						1,03	0,79
1,000	1 168	109	1 064	99	5						1,00	-0,02
1,500	562	100	474	76	12						1,06	1,08
2,000	332	103	251	63	17	2					1,14	1,82
3,000	193	108	104	72	15	2					0,83	-1,64
4,000	103	103	35	41	21	4	2				0,88	-0,84
5,000	59	107	11	19	11	9	6	3			1,15	0,81
Promedio											1,0	

Partículas de ^4He de 20 MeV													
Dosis (Gy)	N	X	Distribución celular de dicéntricos							σ^2/y	u		
			0	1	2	3	4	5	6			7	
0,000	2 000	3	1 997	3								1,00	-0,04
0,051	900	19	881	19								0,98	-0,44
0,104	1 029	27	1 004	23	2							1,12	2,84
0,511	1 136	199	960	154	21	1						1,07	1,60
1,010	304	108	217	69	15	3						1,09	1,15
1,536	142	96	75	40	25	2						0,98	-0,20
2,050	137	120	63	44	16	12	2					1,20	1,65
2,526	144	148	66	34	25	14	3	2				1,40	3,40
3,029	98	108	47	16	17	17	0			1		1,56	3,93
Promedio												1,19	

Para cada dosis analizada se presenta el número total de células examinadas (N), el número total de dicéntricos observados (X), la distribución celular de dicéntricos y el índice de dispersión (σ^2/y) y la prueba de la u (u). Los valores de u superiores a 1,96 indican una sobredispersión.

La técnica propuesta para determinar los mejores coeficientes de ajuste es la de la máxima verosimilitud [104, 105]. Con este método, el mejor valor de ajuste de cada coeficiente se obtiene suponiendo que la distribución es de Poisson y maximizando la verosimilitud de las observaciones mediante el método de la reponderación iterativa de los cuadrados mínimos. Para distribuciones sobredispersas (que no son de Poisson) como las obtenidas con radiación de alta TLE, en las ponderaciones hay que tener en cuenta la

sobredispersión. Si los datos muestran una tendencia estadísticamente significativa de σ^2/y con la dosis, entonces hay que utilizar esa tendencia. En caso contrario, hay que dividir la ponderación de Poisson en cada punto de dato por el valor promedio de σ^2/y .

Seguidamente hay que verificar la bondad del ajuste de la curva y la significación de los coeficientes α y β ajustados, por ejemplo, utilizando la prueba de la ji al cuadrado (χ^2) y una forma apropiada de la prueba de la F (es decir, la prueba de la F , la prueba de la z o la prueba de la t) respectivamente. Esas pruebas se exponen en detalle en el anexo VI. Si hay pruebas de que no se produce ajuste (es decir, que χ^2 es mayor que los grados de libertad (df)), entonces hay que aumentar el error estándar (SE) en $(\chi^2/df)^{1/2}$. Muchos programas informáticos calculan los valores del SE a partir de la suma de los cuadrados, en lugar de utilizar la estimación de Poisson de la varianza, lo que puede, incorrectamente, propiciar una subestimación del error de Poisson. Por esa razón, cuando se calculan los SE con este método, y los df son mayores que χ^2 , es una buena práctica aumentar el SE en $(df/\chi^2)^{1/2}$.

En el cuadro 5 se indican los coeficientes ajustados cuando se utilizan los datos del cuadro 4 y los SE se calculan suponiendo que las distribuciones son de Poisson.

CUADRO 5. RESULTADOS DEL AJUSTE DE LOS DATOS SOBRE DICÉNTRICOS DEL CUADRO 4

Rayos γ (cobalto 60)				
C \pm SE	α (Gy ⁻¹) \pm SE	β (Gy ⁻²) \pm SE	χ^2	df
0,00128 \pm 0,00047	0,02103 \pm 0,00516	0,06307 \pm 0,00401	6,61	8
	$F = 4,08, p < 0,03$	$F = 15,73, p < 0,01$	$p = 0,58$	
Partículas de ⁴ He de 20 MeV				
C \pm SE	α (Gy ⁻¹) \pm SE	β (Gy ⁻²) \pm SE	χ^2	df
0,00143 \pm 0,00093	0,32790 \pm 0,02875	0,02932 \pm 0,01636	7,40	6
	$F = 11,41, p < 0,01$	$F = 1,79, p = 0,25$	$p = 0,39$	
0,00193 \pm 0,00097	0,37290 \pm 0,01787		10,91	7
	$F = 20,87, p^1 < 0,01$		$p = 0,14$	

¹ $F_{,05 [7, 7]} = 3,77$

Los valores de p de la prueba χ^2 que se muestran en el cuadro 5 indican que los puntos de datos ajustados no difieren estadísticamente de los valores ajustados, lo que confirma la bondad del ajuste. Además, la prueba de la F confirmó también la significación de los coeficientes lineal y cuadrático, la razón entre cada coeficiente y su SE; para cada coeficiente, el valor de F era superior a 3,44 (el valor de corte para $F_{,05 [8, 8]}$) y el valor de z era superior a 1,96 (el valor de corte para la distribución; los dos valores figuran en las tablas normalizadas). La prueba de la F , que se describe en el anexo VI, es una razón de dos distribuciones ji al cuadrado, y el valor de $F_{,05 [8, 8]}$ es el valor de corte para $\alpha = 0,05$, para 8 grados de libertad en el numerador y 8 grados de libertad en el denominador. Para las partículas de ⁴He, las ponderaciones se redujeron el valor promedio de σ^2/y , 1,19. El coeficiente de la curva lineal cuadrática no era significativo (valor de corte para $F_{,05 [6, 6]} = 4,28$; $p = 0,12$ en la prueba de la z) razón por la cual se presenta también un ajuste lineal.

Hay diversidad de opiniones acerca del modo en que habría que tratar el nivel de fondo de aberraciones en el ajuste de los datos de dosis-respuesta. En general, existen tres planteamientos: en el procedimiento de ajuste de la curva se incluye un punto de dosis a cero

Gy, se desestima el punto de dosis nula, o bien se representa el punto de dosis nula en todos los procedimientos de ajuste mediante un valor de fondo estándar. Si la producción medida a dosis nula se utiliza como punto de dato en el ajuste de la curva (como es el caso en el ajuste presentado *supra*), el nivel de fondo pasa a ser un parámetro variable. Sin embargo, dado que la producción en las células no irradiadas suele ser baja, a menudo no hay observaciones y la producción a dosis nula es nula. Como se ha comentado, a dosis bajas la resolución estadística de los puntos de datos suele ser baja. Por consiguiente, la inclusión de un punto de dosis nula en el procedimiento de ajuste de la curva a veces puede dar una estimación negativa del valor de fondo (C) y coeficientes lineales negativos (α), lo cual, obviamente, carece de base biológica. Algunos investigadores resuelven el problema desestimando los puntos de datos a dosis nula y forzando la curva a pasar por el origen. Sin embargo, se han publicado suficientes datos a partir de reconocimientos de personas expuestas únicamente a la radiación de fondo para probar que existe un pequeño nivel positivo de fondo de aberraciones. En consecuencia, algunos han adoptado un método alternativo consistente en utilizar un pequeño valor positivo de fondo como punto de dato y asignarle un gran porcentaje de incertidumbre. Es preferible que el laboratorio genere datos de fondo propios, pero ello requiere que se analicen muchos miles de células. Se ha llegado al consenso de que el nivel de fondo de dicéntricos es de $\sim 0,5-1,0$ por 1 000 células [106] mientras que para las traslocaciones [107] y los micronúcleos [108] los valores de control son más elevados.

Se pueden utilizar varios programas para realizar el ajuste de la curva, por ejemplo el Poisson Iteratively Reweighted Least Squares (PIRLS) desarrollado por Peterson para modelos aditivos, multiplicativos, exponenciales y no lineales [109], o se pueden utilizar instrumentos basados en el entorno R². Hay que combinarlos con una rutina redactada específicamente para el ajuste de curvas, que se puede consultar en la presente publicación en el anexo VI-3. Además, la comunidad de citogenetistas de radiaciones ha elaborado recientemente cierto número de programas informáticos especializados en el ajuste de curvas [110]. CABAS [111] aplica métodos de máxima verosimilitud para ajustar los datos de calibración a la ecuación lineal cuadrática. Dose Estimate [112] es un instrumento similar que permite tanto el ajuste lineal como el cuadrático. Además del ajuste de la curva, CABAS y Dose Estimate disponen de instrumentos adicionales que facilitan el procesamiento de los datos de accidentes de radiaciones para derivar las estimaciones de las dosis cuando las circunstancias no corresponden a exposiciones del cuerpo entero o agudas y recientes. Los cálculos abarcados en esas circunstancias se describen en la sección 9.7.

Tanto si se utilizan esos programas u otros, el programa tiene que proporcionar suficiente información sobre los métodos aplicados, así como pormenores de las varianzas y covarianzas de los coeficientes ajustados, puesto que se necesitan para calcular las incertidumbres de las estimaciones de las dosis (sección 9.7.3).

² R es un entorno informático gratuito para realizar cálculos estadísticos que se puede descargar del sitio <http://www.r-project.org/>.

9. ANÁLISIS DE DICÉNTRICOS

El texto que figura a continuación, relativo al cultivo de células, la fijación y la tinción de preparaciones, se ha redactado en el contexto de la prueba de dicéntricos, pero gran parte del material es de interés también para otras pruebas abarcadas en la presente publicación. El examen integral de los procedimientos que hacemos aquí permite que en las secciones que se refieren a otras pruebas baste con detallar los aspectos en que esos procesos se apartan de la prueba de dicéntricos.

Resumiendo, las principales diferencias son las siguientes:

- a) en la prueba de dicéntricos se utilizan cultivos de dos días, mientras que el período se prolonga a tres días en las pruebas de micronúcleos y/o puentes nucleoplásmicos (prueba de micronúcleos y citoma con bloqueo de la citocinesis (CBMN Cyt)).
- b) la condensación prematura de cromosomas por fusión mitótica no precisa cultivo celular, mientras que los métodos con inducción química en general sí.
- c) la prueba de dicéntricos y otras pruebas metafásicas requieren la detención de la mitosis con Colcemid, lo cual no es el caso de la prueba CBMN Cyt.
- d) por el contrario, la prueba CBMN Cyt requiere el bloqueo de la citocinesis con citocalasina B.

9.1. CULTIVO

A la recepción de la muestra de sangre hay que preparar varios cultivos de réplica.

9.1.1. Elección del medio de cultivo

Existen varios tipos definidos de medios de cultivo. Todos ellos se pueden adquirir en el comercio y se ha comprobado que todos son adecuados para el cultivo de linfocitos. No hay que utilizar los medios cuya formulación carece de ácido fólico, destinados a detectar los sitios cromosómicos frágiles adquiridos por herencia. Parece que algunos medios (F-10 y RPMI-1640) propician un crecimiento más rápido que otros, por ejemplo, MEM y TC-199 [113]. Si bien el número de células que se encuentran en la segunda metafase *in vitro* (M2) se puede determinar con fluorescencia combinada con tinción de Giemsa (FPG), una buena práctica es utilizar sistemáticamente un procedimiento de cultivo que en general dé el número mínimo de células M2 a las 48 horas.

El medio se debe enriquecer con L-glutamina, heparina y antibióticos. Comúnmente se utiliza penicilina y estreptomina (se dan pormenores en el anexo I). Dependiendo del fabricante, muchos medios ya contienen esos antibióticos. Sin embargo, puede que sea necesario agregar antibióticos cuando se diluye el medio hasta la concentración de trabajo si se adquieren medios en polvo. Algunos laboratorios prefieren utilizar medios sin antibióticos, en cuyo caso es fundamental adoptar procedimientos de trabajo asépticos, incluido el uso de tubos de muestras de sangre estériles.

9.1.2. Elección del suero

Se debe utilizar suero de ternera fetal o suero humano AB. Dado que pueden darse importantes variaciones entre los lotes de suero, hay que verificar la capacidad de cultivo celular de cada partida que se reciba. Hay que inactivar el suero con calor a 56 ± 1 °C durante 0,5 a 1 horas en un baño María, para reducir la variabilidad entre los lotes. También se pueden cultivar los linfocitos en medios sin suero, que se pueden adquirir en el comercio.

9.1.3. Bromodesoxiuridina

Hay que incluir bromodesoxiuridina (BrdU) en el cultivo para que se pueda aplicar la fluorescencia combinada con la tinción de Giemsa (FPG) [114]. Este análogo de la timidina se capta preferentemente durante la replicación del ADN. Cuando tiene lugar una sustitución bifilar de una cromátida y monofilar de la otra, la tinción FPG produce un efecto arlequinado en el cromosoma metafásico de las células que se encuentran en la segunda (o posterior) división subsiguiente a la sustitución. (Figura 22).

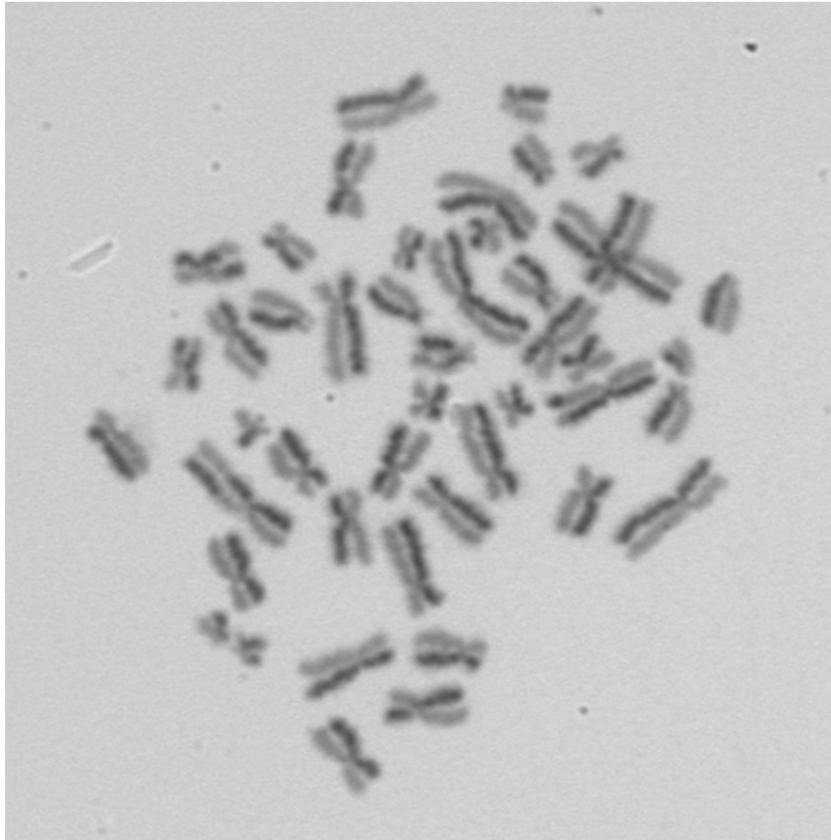


Fig. 22. Metafase de segunda división teñida con el método FPG en la que se aprecia el efecto arlequinado debido a la tinción diferencial de las cromátidas hermanas.

No se ha determinado aún una concentración de BrdU que tenga validez general. El valor óptimo variará en función de factores tales como la concentración de timidina en el medio de cultivo concreto que se utilice. Cada laboratorio debe experimentar por sí mismo con el fin de determinar un nivel satisfactorio. Es habitual agregar BrdU al medio de cultivo en una concentración tal que la concentración en la mezcla de cultivo definitiva no supere aproximadamente los 50 μM (15,4 $\mu\text{g/mL}$). Por encima de ese nivel existe la posibilidad de que la BrdU retrase excesivamente la mitosis [115]. Con muestras de sangre frescas (<24 horas), a menudo es satisfactoria una concentración de cultivo definitiva de alrededor de 15 μM . Si las muestras de sangre se retrasan durante el envío y tienen más de 24 horas, puede que haya que aumentar la concentración de BrdU a, por ejemplo, 40 μM para obtener una tinción FPG fiable [116]. Conviene señalar que la BrdU es fotosensible y que, por consiguiente, hay que preparar los cultivos con una luz atenuada (por ejemplo, con luz de seguridad ámbar) y la incubación se tiene que hacer en la oscuridad. Puede ser útil envolver los recipientes de cultivo con hojas de aluminio.

Si se utiliza el método de la BrdU habrá que elegir para la fijación el momento óptimo en que una elevada proporción de las células analizables se encuentren en la primera fase de división. Desafortunadamente, no siempre es posible predecir el momento óptimo para la

fijación. Puede que se produzcan diferencias no solo como consecuencia de las variaciones individuales sino también debido a los efectos de la radiación en la duración de los ciclos celulares. Las células muy dañadas pueden responder a la estimulación mitogénica con un importante retraso. En la práctica, los laboratorios preparan cultivos para un período único, en general de 48 horas. La opción alternativa sería preparar un gran número de cultivos y fijar réplicas con distintos tiempos de incubación, seleccionando luego la que contenga la más alta frecuencia de células en la primera mitosis. Sin embargo, este procedimiento es largo y costoso y resulta impracticable cuando hay que evaluar rápidamente un gran número de pacientes. De ahí que se haya propuesto una ligera modificación del cultivo. Se puede agregar citocalasina B (Cyt-B), que ordinariamente se utiliza en las preparaciones de micronúcleos (sección 12), a los cultivos de metafases para, de ese modo, distinguir las células que han realizado un número distinto de divisiones y seleccionar a efectos del análisis solo las que se encuentren en la primera mitosis. La Cyt-B se agrega al cultivo a las 24 horas con una concentración final de 2 µg/mL. La técnica fue utilizada por primera vez por Hayata *et al.* [117] para identificar las células que se encontraban en el primer ciclo, y la diferenciación se basaba en el número de cromosomas y no en la tinción arlequinada de las cromátidas hermanas con BrdU. La técnica Cyt-B no está muy difundida para la prueba de dicéntricos pero se ha utilizado con éxito en algunas estimaciones de la dosis en ejercicios de comparación de laboratorios [118, 119].

9.1.4. Mitógenos

Se pueden adquirir en el comercio varios mitógenos, la mayoría de ellos lectinas vegetales. En la mayoría de los casos no se han definido con precisión las poblaciones concretas de linfocitos que estimulan. Se recomienda el uso de la fitohemaglutinina (PHA), que es el mitógeno de uso más generalizado. Varios fabricantes comercializan dos versiones de PHA, a veces denominadas de tipo M y de tipo P. En los cultivos de sangre entera sistemáticos no es necesario utilizar el material más caro y más refinado (P); sin embargo, algunos laboratorios consideran recomendable utilizarlo en el cultivo de linfocitos aislados.

Existen otros mitógenos, por ejemplo, la concanavalina A y la fitolaca, que estimulan ciertos subconjuntos concretos de linfocitos, lo que puede encontrar aplicación en determinados sistemas experimentales y con células no humanas. Ninguno tiene un ámbito de acción tan amplio como la PHA y no se deben utilizar en dosimetría biológica.

9.1.5. Los cultivos

Se puede utilizar vidrio que soporte el autoclave o contenedores de plástico estériles y desechables. La práctica habitual es realizar el cultivo en tubos desechables de 10 mL de fondo redondo. Hay que disponer los tubos, inclinados unos 45° y con los tapones sin apretar, en una incubadora a 37 °C con un 5 % de CO₂. También se pueden cultivar las células en una incubadora sin CO₂, pero en ese caso hay que cerrar los tapones.

Hay que incubar las células a 37,0 ± 0,5 °C. La estabilidad térmica de la incubadora es importante, y es aconsejable controlar su funcionamiento, por ejemplo mediante un termopar y un registro gráfico. Si la temperatura es demasiado baja, la producción de metafases al cabo de 48 horas será escasa o nula. Si la temperatura es alta (38 °C o más), las células realizarán ciclos más deprisa y puede que al cabo de 48 horas haya un número inaceptablemente alto de metafases de segunda división. [120] En un laboratorio que trabaje mucho y donde se comparta la incubadora, puede que el aparato se abra y cierre a menudo y exista el riesgo de que, incluso si dispone de ventilador, la temperatura de los cultivos descienda por debajo del punto óptimo durante un tiempo apreciable. Como opción alternativa se puede utilizar para la incubación un baño María controlado mediante termostato. En ese caso, la transferencia de calor al cultivo es más rápida que a través del aire y la estabilidad térmica es mayor a lo largo de las 48 horas.

Si se utiliza este método, el espacio de cabeza de los recipientes de cultivo de 5 mL tiene que ser de por lo menos 10 mL y hay que insuflar aire con un 5 % de CO₂ filtrado. Las tapas de los recipientes se tienen que sellar herméticamente. El baño María se tiene que poder tapar, para que los cultivos que contienen BrdU estén a oscuras.

Los métodos de cultivo se basan, con modificaciones, en las técnicas publicadas originalmente por Moorhead *et al.* [121] y Hungerford [122]. En síntesis, se pueden crear cultivos con sangre entera o con linfocitos aislados. Las ventajas e inconvenientes de las técnicas tienen que ver con los volúmenes de la muestra de sangre proporcionada, el tiempo que se tarda en crear el cultivo y el número de metafases recontables (índice mitótico más elevado) que se obtienen. Los criterios aplicados para determinar el índice mitótico figuran en el anexo V.

9.1.5.1. Sangre entera

Este método se puede utilizar con muestras de sangre pequeñas (1–2 mL) y, de ser necesario, se puede aplicar a sangre obtenida por punción digital. Otra ventaja es la velocidad y la facilidad con que se crean los cultivos. Sin embargo, en general, el número de metafases que se obtienen por portaobjetos es inferior al que dan otros métodos. El procedimiento consiste en agregar 0,3 mL de sangre entera y 0,1 mL de solución de trabajo de PHA a un recipiente que contenga 4 mL de medio y 1 mL de suero, y a continuación incubar.

9.1.5.2. Linfocitos aislados

En este método se agrega al medio un inóculo enriquecido de linfocitos. Es adecuado para los casos en que se dispone de una muestra de sangre de más de 3 mL. Existen dos técnicas para obtener inóculos enriquecidos:

- a) En primer lugar, se agregan 0,15 mL de PHA a 2 mL de sangre y se agita suavemente la mezcla. La sangre se aglutinará en las paredes del recipiente. A continuación se agregan 2 mL de suero, se mezclan suavemente y se centrifuga durante un minuto a 50 g. Se retira con una jeringa el sobrenadante, de alrededor de 3 mL y compuesto por suero, plasma y la capa de leucocitos, con lo que quedará la mayor parte de los eritrocitos aglutinados. Es útil revolver la capa de leucocitos con la punta de la aguja al aspirar el sobrenadante. Utilícese una aguja de gran calibre, para ejercer el mínimo de tensión en las células. Los 3 mL de líquido bastan para sembrar dos cultivos y se dividen a partes iguales en dos recipientes con 4 mL de medio cada uno.
- b) En segundo lugar, los linfocitos se pueden separar de la sangre entera estratificando la sangre en una columna de Ficoll Hypaque estéril. Se encuentran en el comercio tubos ya preparados para la separación de linfocitos. Se centrifugan los tubos y se retira la capa rica en linfocitos, que se lavan con solución salina tamponada con fosfato y se agregan al cultivo. La concentración de células viables se puede determinar aplicando el método de tinción por exclusión a una pequeña fracción, que se recuenta en un hematocitómetro. De este modo, la concentración de células del cultivo se puede ajustar a un valor óptimo. Es probable que ese valor difiera entre laboratorios, por lo que hay que determinarlo independientemente, si bien posiblemente se sitúe en el margen de 0,5 a 2,0 x 10⁶ /mL. Hayata *et al.* y McFee *et al.* han preparado un protocolo pormenorizado al respecto [123, 124], y señalan que el método se adecua particularmente a la producción de preparaciones con gran número de metafases. Algunos laboratorios consideran más adecuado utilizar cultivos separados de linfocitos para análisis FISH, también cuando preparan montajes para escaneado con dispositivos de detección automatizada de metafases (secciones, 10 y 13.3.1). Probablemente sea innecesariamente complicado para el recuento de tinciones de Giemsa convencionales al microscopio óptico normal, cuando basta el método (a), o el cultivo de sangre entera.

9.1.6. Detención de la mitosis

Se pueden utilizar la colchicina o su análogo sintético, la demecolcina (Colcemid), agente este último preferido por la mayoría de los investigadores. Una solución madre adecuada contendrá 10 µg/mL de Colcemid en solución fisiológica y, si se prepara en condiciones asépticas y se mantiene a 4 °C, se conservará durante seis meses. La adición de 25–50 µL de esta solución a los cultivos de 5,0 mL (concentración final de 0,05–0,1 µg/mL) proporcionará un número suficiente de metafases y evitará a la vez los problemas de toxicidad celular ocasionados por las concentraciones superiores. El Colcemid suele agregarse de 2 a 3 horas antes de la finalización de los cultivos. Unos pocos investigadores [125] prefieren agregar el Colcemid hacia la mitad del período de cultivo, es decir, al cabo de unas 24 horas, o en algunos casos al principio del cultivo [123]. De este modo se impide que las células pasen de la primera metafase y, por consiguiente, es una forma distinta de impedir que se analicen células en M2. Cabe señalar que la adición temprana de Colcemid puede provocar una contracción excesiva de los cromosomas, a menos que la concentración final de cultivo se reduzca considerablemente, hasta alrededor de 0,05 µg/mL [123]. La adición temprana de Colcemid hace posible que los cultivos se prolonguen más allá de las 48 horas, lo que se acomoda a los ciclos celulares más lentos de algunas personas, por ejemplo, las de edad avanzada.

9.2. PROCEDIMIENTO DE FIJACIÓN

Ordinariamente, los cultivos de linfocitos se incuban durante 48 horas, aunque la duración exacta puede variar entre laboratorios desde 46 hasta 52 horas. Los laboratorios establecerán la duración óptima que en principio da lugar a buenas producciones de metafases M1 con sus procedimientos de rutina. Asimismo, es aconsejable fijar solo algunos de los cultivos replicados con la duración habitual, dejando los demás en la incubadora. De ese modo se tiene en cuenta la posibilidad de que las células de algunos donantes tarden más en llegar a la metafase, y también permite que se recuenten más tarde las células en las que una dosis alta pueda haber retrasado la mitosis.

Una vez terminados los cultivos no es necesario seguir respetando un procedimiento aséptico y, salvo cuando así se especifique, el resto del procedimiento se puede llevar a cabo a temperatura ambiente. Sin embargo, es importante mantener las prácticas de manipulación segura, puesto que las muestras de sangre pueden contener patógenos humanos. Los cultivos se centrifugarán y se eliminará el sobrenadante, que se sustituirá por una solución hipotónica (5 mL) de cloruro potásico 0,075 M. Si el sobrenadante se elimina por succión, la velocidad de centrifugación será de 200 g durante 10 min. Por el contrario, si se retira de otro modo es necesario que la pastilla sea más compacta y hará falta centrifugar a 600 g durante 3 min, aunque es posible que ello provoque la rotura de algunas células. Los tubos se dejarán aproximadamente 15 min a 37 °C, pero si se utilizan linfocitos separados bastarán de 3 a 5 min. Es posible también agregar alrededor de 1 mL de fijador a la solución hipotónica durante 5 a 10 min, para que la rotura de células después de la centrifugación sea mínima. Seguidamente hay que centrifugar de nuevo los tubos, eliminar la solución hipotónica y resuspender la pastilla de células en 5–10 mL de fijador recién preparado (metanol/ácido acético 3:1). El fijador se debe agregar lentamente pero con un caudal constante, agitando el tubo, por ejemplo con una mezcladora vorticial. Se trata de un aspecto importante, porque de ese modo nos aseguramos de que las células se dispersan en una suspensión uniforme. A continuación, las células se centrifugan de nuevo y se resuspenden en fijador, tres veces. De ser necesario, las células se pueden conservar durante largo tiempo, preferiblemente en un congelador a -20 °C. En caso contrario, se pueden obtener preparaciones ya sea inmediatamente o el día siguiente, y la suspensión de células se puede conservar durante un tiempo breve a 4 °C.

Se elimina el último líquido de lavado de fijación, dejando una cantidad suficiente (0,25 mL) para que se disponga del volumen de suspensión necesario para cargar los portaobjetos. Sin embargo, el volumen final dependerá de la densidad de células, y si fuera necesario se podrá diluir agregando más solución fijadora. Hay que utilizar portaobjetos limpios, que no contengan grasa. Aunque algunos fabricantes aseguran que sus portaobjetos están suficientemente limpios, muchos laboratorios prefieren cerciorarse doblemente y los guardan en un líquido desengrasante, que puede ser una mezcla 1:1 de acetona y metanol, o una mezcla 1:1 de éter y etanol o una solución de ácido clorhídrico concentrado al 1 % en metanol. Si es necesario, los portaobjetos se pueden secar y pulir con papel de seda limpio. Téngase presente que los pañuelos de papel de calidad no son adecuados, porque se les agrega lanolina para que sean más suaves. La separación de los cromosomas mejora si los portaobjetos están fríos y húmedos. A ese efecto se pueden guardar los portaobjetos en la nevera, sacándolos justo antes de utilizarlos y fundiendo la escarcha con el aliento unos instantes antes de depositar las células. O bien, se pueden sumergir los portaobjetos durante breves segundos en un recipiente con agua destilada y cubitos de hielo. Mejora la humectación de los portaobjetos agregando algo de metanol al agua helada, sin revolver. Hay que eliminar el líquido del portaobjetos sacudiéndolo inmediatamente antes de depositar las células. La experiencia muestra que la extensión de los cromosomas puede verse influida en gran medida por la temperatura ambiente y la humedad relativa del laboratorio. La variación de calidad debida a estos factores se puede superar depositando las células en una vitrina de ambiente controlado. En el comercio se encuentran vitrinas diseñadas específicamente para los laboratorios de citogenética.

Hay que suspender las células íntegramente en el resto de fijador y depositar con una pipeta dos o tres gotas en el portaobjetos. Las células de un mismo cultivo se depositarán en dos portaobjetos por lo menos, aunque muchos técnicos prefieren preparar hasta diez portaobjetos a partir de cada cultivo. Antes de montar todos los portaobjetos de un mismo cultivo, es una buena práctica colocar una gota en una preparación de prueba. Se puede así evaluar la concentración de metafases y, en caso necesario, concentrar o diluir el resto de la suspensión con fijador. Si la apariencia de las metafases en el portaobjetos de prueba es mala, es decir, si los cromosomas no se han extendido bien y se observa una cantidad excesiva de restos, a menudo va bien agregar uno o más lavados con fijador, tapar los tubos y guardarlos una noche en la nevera, centrifugándolos y montando las preparaciones el día siguiente. Los portaobjetos se deben secar al aire, lo que se puede acelerar calentándolos suavemente en una placa calefactora, colocándolos en una corriente de aire caliente suave, o agitándolos sobre un mechero (evitando que se inflame el fijador).

9.3. TINCIÓN

Se recomienda utilizar fluorescencia más tinción de Giemsa (FPG) puesto que de este modo el análisis se puede confinar a las metafases de la primera división *in vitro* (M1) [126]. Sin embargo, el método presenta ciertos inconvenientes, que se pueden contrarrestar utilizando la tinción de Giemsa convencional además de la FPG. Muchos técnicos han observado variaciones considerables en la calidad de la tinción FPG entre preparaciones réplicas, así como entre zonas distintas de una misma preparación. La técnica FPG da los mejores resultados si su aplicación se retrasa hasta unos pocos días (hasta cinco) después de haber montado la preparación. El resto de las preparaciones se pueden guardar en una caja, manteniéndolas a -20 °C hasta su uso. La calidad es peor cuando se utilizan preparaciones más recientes o si las preparaciones tienen más de dos o tres semanas de antigüedad. Si el recuento no se realiza en unas pocas semanas, las preparaciones teñidas con FPG se pueden deteriorar. Por lo tanto, existe el riesgo de que las imágenes de metafases teñidas con FPG no sean suficientemente claras para que se puedan distinguir con exactitud todas las aberraciones. No obstante, la calidad suele ser suficiente para determinar las proporciones relativas de células M1, que no se tiñen distintivamente, y células M2, que aparecen arlequinadas. A

efectos de control positivo de que la tinción ha funcionado, el lote de preparaciones debe contener también unos pocos portaobjetos con preparaciones obtenidas a partir de cultivos más prolongados (72 horas) de los que conste que contienen células M2.

Por lo tanto, el protocolo recomendado es teñir con FPG una o más réplicas a partir de cada cultivo. Si la tinción es buena, se podrán utilizar para examinar las aberraciones en las células M1. Si no, las preparaciones se deberán utilizar para determinar la razón M1/M2, y el análisis de las aberraciones se llevará a cabo con réplicas obtenidas del mismo cultivo teñidas con Giemsa, siempre y cuando el nivel de células M2 sea inferior al 5 % según la estimación realizada con FPG. Si el nivel es superior, puede que sea necesario ajustar la producción de aberraciones, lo que podría introducir cierto error adicional. Ello obligará a admitir determinadas presunciones acerca, por ejemplo, de la proporción de dicéntricos en las células M2 que aún contengan un fragmento acéntrico. Como se ha subrayado antes, es mejor práctica adoptar un método de cultivo que en general produzca menos células M2, aunque, por supuesto, ello no se pueda predecir para una persona en concreto, porque la capacidad de estimulación y de proliferación de los linfocitos varía entre personas [127].

La adaptación a técnicas de cultivo alternativas tales como el uso de Cyt-B con Colcemid o de Colcemid en etapas tempranas puede constituir una alternativa más fácil y rápida que la tinción FPG [117–119, 125]. Esas técnicas pueden ser particularmente preferibles cuando hay que realizar triajes y es necesario estimar las dosis rápidamente.

9.3.1. Pretratamiento

El pretratamiento de las preparaciones con ribonucleasa A, antes de la tinción, puede eliminar residuos de material citoplasmático teñible [128]. Se trata de un procedimiento opcional que puede dar imágenes mucho más claras de los cromosomas para el recuento de preparaciones con tinciones en bloque, arlequinadas o bandeos. Además, se ha comprobado su utilidad en las preparaciones destinadas a sistemas de análisis automatizado de la imagen.

El protocolo es como sigue: Se calienta durante 10 min a 70 °C una solución madre de 10 mg/mL de ribonucleasa A en tampón Tris EDTA y seguidamente se la deja enfriar lentamente. Se pueden conservar fracciones de la solución durante varios años a -20 °C. Se aclaran los portaobjetos en agua destilada y se sumergen en una solución de ribonucleasa A de 0,5 mg/mL (solución madre: agua destilada 1: 20) durante 10 min a 37 °C. A ese efecto se puede utilizar una cubeta de tinción precalentada o, para ahorrar, se puede colocar un volumen menor de la solución madre diluida debajo de un cubreobjetos. Seguidamente se lavan los portaobjetos en agua destilada, se colocan durante 2 min en metanol: ácido acético 3:1, se secan y se tiñen según se describe más adelante. El procedimiento de limpieza de la ribonucleasa A también se puede utilizar después de desteñir preparaciones antiguas o en preparaciones de micronúcleos. Para esas aplicaciones, las concentraciones y los tiempos pueden variar [128].

9.3.2. Tinción de fluorescencia más Giemsa (FPG)

El método deriva del que publicaron Perry y Wolff [114], con algunas modificaciones. Se colocan en el portaobjetos, debajo de un cubreobjetos y asegurándose de que no queden burbujas de aire, alrededor de diez gotas de tinción Hoechst 33258 (0,5 µg/mL en tampón fosfato de pH 6,8). Aquí, si se desea, se puede verificar rápidamente con un microscopio de fluorescencia la razón M1/M2 aplicando el método de Latt [129], que produce un efecto arlequinado de duración muy breve. Otra opción es iluminar los portaobjetos con una lámpara ultravioleta de 20 W (>310 nm) durante 0,5 horas, o bien con una barra luminosa fluorescente de 30 W durante alrededor de 1,5 horas. Una vez retirados los cubreobjetos cuidadosamente, se lavan bien los portaobjetos con tampón fosfato de pH 6,8. En este momento, algunos técnicos colocan los portaobjetos en SSC 2 x (cloruro de sodio 0,3M y citrato sódico 0,03M) a 60 °C durante aproximadamente 20–30 min.

La experiencia ha mostrado que esta fase con SSC se puede omitir si provoca un engrosamiento no deseado de las cromátidas que dificulta el análisis al microscopio. Sin embargo, el uso de SSC 2 x elimina algunos restos celulares, con lo que facilita la obtención de preparaciones más limpias. Seguidamente, las preparaciones se lavan en agua destilada y a continuación se sumergen en colorante de Giemsa (5–10 % en tampón de pH 6,8, R66 de Gurr) durante 3 a 5 min. Se aclaran con tampón y luego con agua destilada, y se dejan secar. En este momento las preparaciones se pueden examinar al microscopio, o se aclaran y se montan bajo un cubreobjetos.

9.3.3. Tinción de Giemsa convencional

Los portaobjetos se sumergen en colorante de Giemsa al 2 % (R66 mejorado de Gurr) con tampón fosfato de pH 6,8 durante 5 min, se lavan en tampón, se aclaran brevemente con agua destilada y se dejan secar, montándolos por último con un cubreobjetos utilizando un medio de montaje. En las figuras 10 y 11 se muestran metafases teñidas con Giemsa.

La tinción se puede modificar para que destaquen específicamente los centrómeros, pero para técnicos experimentados ello no suele ser necesario [130]. Ese efecto se puede lograr con el método FISH, mediante una sonda pancentromérica (figura 27) o con tinción Giemsa utilizando el método de bandeo C (figura 23).



Fig. 23. Metafase teñida con Giemsa utilizando el método de bandeo C, que destaca los centrómeros.

El protocolo para el bandeo C es el siguiente:

- 1) Se colocan los portaobjetos en ácido clorhídrico 0,2 N a temperatura ambiente durante 30 min.
- 2) Se lava tres veces en agua destilada.
- 3) Se colocan los portaobjetos en hidróxido de bario al 5 % a 60°C durante 1 min.
- 4) Se lava en HCl 0,2 N durante 2 min.

- 5) Se lava en agua destilada durante 2 min.
- 6) Se colocan los portaobjetos en SSC 2x a 60° C durante 45 min.
- 7) Se lava en agua destilada.
- 8) Se deja secar al aire y se tiñe con Giemsa al 2 % con tampón fosfato de pH 6,8 durante 10 min.
- 9) Si la intensidad de la tinción es insuficiente, se pueden volver a sumergir los portaobjetos en el colorante de Giemsa durante otros 5–10 min.

9.4. ANÁLISIS DE LAS PREPARACIONES

9.4.1. Microscopia convencional

Hay que asignar un código a cada preparación, para evitar sesgos en el recuento, y hay que examinar las preparaciones metódicamente, para abarcar la totalidad de la superficie. El examen se realizará con poco aumento (alrededor de x 100 a x 200). En ese momento no se puede determinar si están presentes todos los cromosomas ni se pueden detectar aberraciones. Sin embargo, con la práctica el técnico puede identificar las preparaciones que presentan unos 40 elementos o más y una apariencia que hace probable que a mayor aumento tengan calidad suficiente para realizar el análisis. Es importante que este examen inicial se realice con un aumento suficientemente bajo para evitar el sesgo en favor de las células que contienen aberraciones. Cuando se encuentra una metafase hay que pasar a un gran aumento (alrededor de x 1 000 a x 2 000) y, haciendo caso omiso en lo posible de la presencia de aberraciones, decidir rápidamente si los cromosomas son de calidad adecuada para realizar el recuento. La decisión se adoptará sobre la base de la nitidez de las imágenes y del grado en que los cromosomas aparezcan retorcidos y solapados. Si se ha utilizado la tinción FPG se descartarán las células que presenten un efecto arlequinado, pues ello indicará que no se trata de una preparación de M1.

Si se decide analizar la extensión, hay que contar el número de trozos de cromosomas y observar la presencia de aberraciones. Se recomienda registrar únicamente las metafases completas, es decir, las que tengan 46 centrómeros. Si la célula contiene aberraciones inestables, tienen que estar en equilibrio. Por ejemplo, si una extensión presenta un dicéntrico, deberá tener también un fragmento acéntrico, pero a efectos de recuento se seguirá considerando que contiene 46 elementos. En cambio, un anillo céntrico irá acompañado también de un fragmento, pero se considerará que el número total de objetos de la célula es de 47. Cada acéntrico en exceso que no esté asociado a un dicéntrico o a un anillo céntrico aumentará el recuento de trozos por encima de los 46. Al registrar las aberraciones, los fragmentos asociados a un dicéntrico o un anillo no se incluirán en el recuento de acéntricos en exceso. Cuando ha habido irradiación a altas dosis puede que en la extensión se observe más de una aberración, pero los trozos tienen que seguir estando en equilibrio. Las aberraciones tricéntricas equivalen a dos dicéntricos y deben ir acompañadas de dos fragmentos, las tetracéntricas tendrán tres fragmentos, etc. Hay que registrar todas las anormalidades, aunque a efectos de la dosimetría ordinariamente solo se utilicen los datos referentes a los dicéntricos más los anillos. Hay que registrar, para posible referencia en el futuro, las coordenadas x e y de la platina de todas las células completas que se hayan analizado, incluidas las que no presenten aberraciones.

9.4.2. Microscopia asistida por ordenador

En muchos laboratorios se utilizan sistemas de identificación de las metafases por reconocimiento automático de pautas, y en el comercio se pueden encontrar varios de ellos. Esos instrumentos disponen también de un análisis semiautomatizado de imágenes digitales

que facilitan la localización de los cromosomas aberrantes. Sin embargo, ninguno de los sistemas es totalmente automático; en todos ellos hay pasos donde el operador, basándose en su criterio, tiene que adoptar una decisión. En el uso de esos instrumentos se tienen que aplicar los mismos criterios que se han recomendado más arriba, a saber, que la selección de las metafases en las que se vaya a efectuar el recuento no introduzca un sesgo que pueda distorsionar la producción de aberraciones y que solo se recuenten las extensiones cromosómicas completas. En la sección 13 se examinan pormenorizadamente los sistemas de identificación y recuento.

9.5. REGISTRO DE LOS DATOS

Las buenas prácticas de laboratorio requieren que se utilice un código de identificación exclusivo, o un sistema de etiquetado, para las muestras, las preparaciones y la documentación conexas. Hay que anotar en el diario del laboratorio la llegada y el procesamiento de las muestras, ya sea para la realización de experimentos o para determinar sobredosis. Existen sistemas electrónicos de almacenamiento y tratamiento de datos (véase la sección 13.4). Sin embargo, muchos investigadores siguen anotando las observaciones al microscopio en plantillas de recuento y la mayoría de los laboratorios han ideado modos propios de registrar los datos. Los sistemas electrónicos pueden almacenar y mostrar los datos de diversos modos, según convenga al laboratorio. Es importante que se puedan recuperar los datos primarios referentes a las observaciones efectuadas en cada célula, para que posteriormente se puedan realizar todo tipo de compilaciones y agregaciones.

En el cuadro 6 se muestra una plantilla simple de registro de aberraciones.

CUADRO 6. PLANTILLA PARA EL REGISTRO DE ABERRACIONES

Preparación N°:
Examinador:
Microscopio N°:
Fecha:

Célula N°	Coordenadas de la platina		N° de trozos de cromosoma	Dicéntricos	Anillos céntricos	Acéntricos en exceso	Observaciones
	x	y					
1	100,1	1,2	46				
2	103,4	1,5	47	1		1	
3	105,4	1,2	49	2	1	2	
4	112,4	1,6	46				
5	112,7	1,8	48			2	
6	120,1	1,2	46	1			
7	122,7	1,5	47		1		
8	124,1	1,4	45				Intercambio cromatídico
9	126,8	1,7	46	2*			*= 1 tricéntrico
etc.							

A partir de la información registrada en esta plantilla se puede identificar cualquier célula si se desea volver a examinarla en el futuro. Utilizando la técnica de tinción de Giemsa convencional los datos sobre aberraciones inestables son de la mayor importancia para la dosimetría biológica, si bien no se ha intentado enumerar por separado los minicromosomas, los fragmentos y los anillos céntricos. La razón de ello es que no siempre se puede distinguirlos con exactitud. Sin embargo, si se prefiere, se pueden anotar como M, F y AC, respectivamente, en lugar de asignarles un número en la columna titulada “Acéntricos en exceso”. En la columna de observaciones se pueden anotar otras anomalías, por ejemplo, aberraciones numéricas, lesiones cromosómicas estables o aberraciones cromatídicas. Se podrá obtener de la plantilla fácilmente cualquier otra información numérica que se precise tal como el porcentaje de células con lesiones o la distribución de las aberraciones entre las células.

9.6. ALMACENAMIENTO DE LA INFORMACIÓN Y LAS PREPARACIONES

Manifiestamente, los datos de los estudios se tienen que clasificar y conservar para futuras consultas. Vale la pena subrayar la posibilidad de que los archivos relativos a casos de sobredosis se tengan que volver a examinar mucho tiempo después. Si una persona presenta una patología maligna, incluso varios decenios después, puede que el caso se vuelva a abrir para resolver una solicitud de compensación.

La mayoría de los laboratorios desearían guardar también las preparaciones microscópicas, o están obligados a guardarlas, lo que puede resultar problemático. Ordinariamente, las preparaciones obtenidas con Giemsa tienden a desteñirse, dificultad que se agrava en el caso del material preparado con FPG, que a menudo se ha desteñado al cabo de varios meses. Es recomendable conservar las preparaciones teñidas en una caja, en un lugar seco y a temperatura ambiente. Sin embargo, las preparaciones desteñidas se pueden recuperar retirando cuidadosamente el cubreobjetos y aplicando de nuevo una tinción de Giemsa convencional. Los intentos de volver a teñir con FPG no dan buen resultado. Las preparaciones de réplica conservadas sin teñir a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se pueden también teñir con Giemsa convencional al cabo de muchos años.

Asimismo, es una buena práctica guardar las células fijadas sobrantes de las determinaciones de sobredosis. Para facilitar el almacenamiento se pueden concentrar en pequeñas ampollas de 2 mL y guardar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si es necesario, años después las preparaciones obtenidas a partir de este material se pueden teñir de modo convencional con FPG o FISH.

9.7. ESTIMACIÓN DE LA DOSIS

9.7.1. Elección de la curva

Las radiaciones a las que está expuesto el personal suelen ser rayos gamma, rayos X y, ocasionalmente, neutrones degradados. Habitualmente se constata una diferencia entre las curvas de producción de los rayos X y los rayos gamma, en particular a dosis bajas ($<0,5\text{ Gy}$). Por consiguiente, es aconsejable disponer de una curva de calibración para rayos X de energía adecuada (por ejemplo, 200–250 kVp) así como para ^{60}Co o ^{137}Cs . En general, la mayoría de los laboratorios de investigación puede disponer más fácilmente de fuentes de ^{60}Co que de ^{137}Cs . Para los neutrones, un espectro de energía degradado es similar a un espectro de fisión. Los datos disponibles indican que las curvas de dosis-respuesta para los neutrones del espectro de fisión son lineales y no se alteran en gran medida con la energía de los neutrones. Por consiguiente, debería bastar una curva de calibración obtenida con un espectro de fisión.

En radiografía industrial se utiliza comúnmente ^{192}Ir y su energía gamma es, en promedio, de 400 keV. Pocos laboratorios pueden disponer de este isótopo para preparar curvas de calibración que se sitúen entre las curvas de los rayos X y de rayos gamma

de $^{60}\text{Co}/^{137}\text{Cs}$. Sin embargo, en general se considera que se sitúa más cerca de esta última, por lo que se recomienda utilizar la curva de rayos gamma.

9.7.2. Número de células que hay que analizar

Para obtener una estimación de la dosis con una incertidumbre estadística suficientemente pequeña para que tenga validez es necesario examinar un gran número de células. La decisión acerca de la cantidad que hay que analizar es un compromiso entre la importancia del caso, la capacidad de trabajo disponible y la calidad de las preparaciones. Por ejemplo, tras una exposición a una dosis de varios Gy o más, el recuento linfocitario puede ser extremadamente bajo, lo que hará que las preparaciones contengan un número escaso de metafases. Sin embargo, dado que el número de aberraciones por célula será alto, se podrá realizar una estimación razonable a partir del análisis de solo unas pocas decenas de células. Cuando se aplica la prueba de dicéntricos a modo de instrumento de triaje para realizar una evaluación rápida después de un suceso que haya causado gran número de víctimas, es importante considerar la incertidumbre de la dosis frente al número de células examinadas. La cuestión se considera con más profundidad más adelante (sección 14).

A dosis bajas, cuando el número de células disponibles no es un factor limitativo, la estimación de la dosis se puede realizar sobre la base de alrededor de 500 células. Con un microscopio convencional, para ello se necesitarán de 2 a 3 días-persona, si bien en una emergencia pueden colaborar varias personas en el recuento de preparaciones replicadas. Para producciones de dicéntricos bajas o nulas, los límites de confianza obtenidos del recuento de 500 células suelen ser suficientes. La decisión de ampliar el recuento de 500 a 1 000 células o más dependerá de la existencia de datos que indiquen que se ha producido una sobreexposición grave que justifique la ampliación del análisis, o si está amenazada la persistencia del empleo de un trabajador expuesto a la radiación. Manifiestamente, no se puede recomendar el examen de un número concreto de células en todos los casos. Sin embargo, a modo de regla general se sugiere recontar 500 células, o 100 dicéntricos, para obtener una estimación razonablemente exacta de la dosis.

En el cuadro 7 se muestran los límites calculados aplicando este método a varias estimaciones de dosis de hasta 1,0 Gy.

CUADRO 7. EFECTO DEL AUMENTO DEL NÚMERO DE CÉLULAS EXAMINADAS EN LOS LÍMITES DE CONFIANZA DEL 95 % INFERIOR Y SUPERIOR PARA CUATRO ESTIMACIONES DE UNA DOSIS AGUDA DE RAYOS GAMMA
(basado en la curva de la figura 24)

Dosis estimada, mGy	Límites de confianza	Nº de células examinadas	
		500	1 000
100	Superior	320	245
	Inferior	< 0	16
250	Superior	448	380
	Inferior	111	141
500	Superior	677	627
	Inferior	333	383
1 000	Superior	1178	1127
	Inferior	830	881

En la sección siguiente, 9.7.3, se examina un método simple para calcular los límites de las estimaciones de la dosis.

9.7.3. Incertidumbre de las estimaciones de la dosis

Aunque no es difícil deducir una dosis a partir de las producciones de dicéntricos medidas, la incertidumbre de la producción se puede determinar de varios modos. Se trata de expresar la incertidumbre en forma de un intervalo de confianza, y la práctica habitual es calcular los límites del 95 %. Los límites de confianza del 95 % definen un intervalo que abarca la dosis verdadera en un mínimo del 95 % de las ocasiones. La dificultad a la hora de calcular los límites de confianza se debe a que la incertidumbre tiene dos componentes: uno debido al carácter de distribución de Poisson que tiene la producción de aberraciones, como se observa en el ejemplo de la persona sobreexpuesta, y otro resultante de las incertidumbres asociadas a la curva de calibración, cuya distribución es aproximadamente normal. El problema lo han abordado en la bibliografía Savage *et al.* [131], Merkle [105] y, más recientemente, Szłuińska *et al.* [132]. En la solución más sencilla, propuesta por Merkle, se tienen en cuenta tanto el error de Poisson de la producción como los errores de la curva de calibración.

El planteamiento de Merkle, ilustrado en la figura 24, consta de los pasos siguientes:

- 1) Suponiendo que la distribución es de Poisson, se calculan las producciones correspondientes a los límites de confianza del 95 % inferior y superior sobre la producción observada (Y_L y Y_U).
- 2) Se calcula la dosis a la cual Y_L interseca la curva superior. Ese será el límite de confianza inferior (D_L).
- 3) Se calcula la dosis a la cual Y_U interseca la curva inferior. Ese será el límite de confianza superior (D_U).

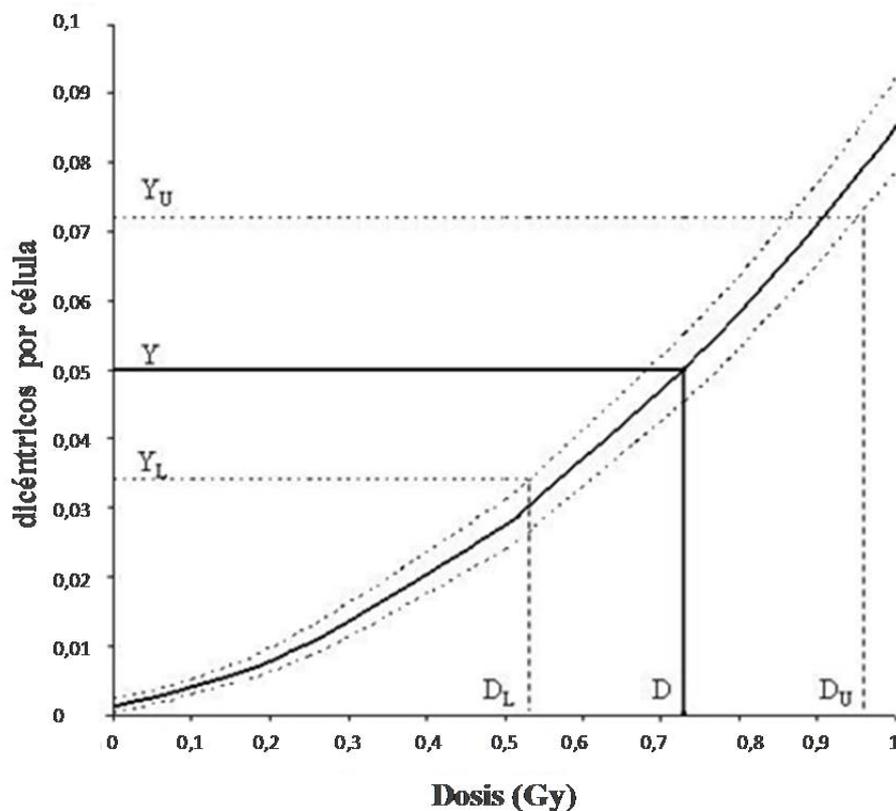


Fig. 24. Curva de calibración dosis-respuesta con sus límites de confianza del 95 % utilizada para estimar las incertidumbres.

Ejemplo: Se analizaron 500 células y en 25 de ellas se observó un dicéntrico. Por lo tanto, la producción (Y) es de 0,05 dicéntricos / célula y el índice de dispersión y la prueba de la u son de 0,95 y -0,78, respectivamente. La dosis se estimó utilizando la curva de dosis-efecto para ^{60}Co que se muestra en la figura 24, cuyos coeficientes, varianzas y covarianzas se enumeran más adelante.

$$\begin{aligned} C &= 1,28\text{E-}3 \\ \alpha &= 2,10\text{E-}2 \\ \beta &= 6,31\text{E-}2 \\ \text{var } C &= 2,22\text{E-}07 \\ \text{var } \alpha &= 2,66\text{E-}05 \\ \text{var } \beta &= 1,61\text{E-}05 \\ \text{covar } (C, \alpha) &= -9,95\text{E-}07 \\ \text{covar } (C, \beta) &= 4,38\text{E-}07 \\ \text{covar } (\alpha, \beta) &= -1,512\text{E-}05 \end{aligned}$$

- 1) Dado que la curva de dosis-efecto es lineal cuadrática ($Y = C + \alpha D + \beta D^2$), la dosis estimada de 0,73 Gy se obtiene resolviendo la ecuación:

$$D = \frac{-\alpha + \sqrt{\alpha^2 + 4\beta(Y - C)}}{2\beta} \quad (6)$$

- 2) Y_L y Y_U se obtienen a partir de tablas estadísticas normalizadas de los límites de confianza previstos para una variable de Poisson [133]. En el cuadro 8 se muestran los límites del 95 % para valores de dicéntricos observados de 0 a 103. Para los 25 dicéntricos observados en este ejemplo, Y_L vale $16,768/500 = 0,034$ e Y_U vale $36,03/500 = 0,072$.

CUADRO 8. LÍMITES DE CONFIANZA DEL 95 % SUPERIOR E INFERIOR PARA EL NÚMERO (X) DE DICÉNTRICOS OBSERVADOS

(adaptado a partir de [133])

X	Inferior	Superior	X	Inferior	Superior	X	Inferior	Superior	X	Inferior	Superior
0	0	3,285	26	16,77	37,67	52	38,165	66,76	78	61,9	96,06
1	0,051	5,323	27	17,63	38,165	53	39,76	68,1	79	62,81	97,545
2	0,355	6,686	28	19,05	39,76	54	4,094	69,62	80	62,81	99,17
3	0,818	8,102	29	19,05	40,94	55	40,94	71,09	81	63,49	99,17
4	1,366	9,598	30	20,335	41,75	56	41,75	71,28	82	64,95	100,32
5	1,97	11,177	31	21,36	43,45	57	43,45	72,66	83	66,76	101,71
6	2,613	12,817	32	21,36	44,26	58	44,26	74,22	84	66,76	103,315
7	3,285	13,765	33	22,945	45,28	59	44,26	75,49	85	66,76	104,4
8	3,285	14,921	34	23,76	47,025	60	45,28	75,785	86	68,1	104,58
9	4,46	16,768	35	23,76	47,69	61	47,025	77,16	87	69,62	105,905
10	5,323	17,633	36	25,4	48,74	62	47,69	78,73	88	71,02	107,32
11	5,323	19,05	37	26,31	50,42	63	47,69	79,98	89	71,09	109,11
12	6,686	20,335	38	26,31	51,29	64	48,74	80,25	90	71,28	109,61
13	6,686	21,364	39	27,735	52,15	65	50,42	81,61	91	72,66	110,11
14	8,102	22,945	40	28,97	53,72	66	51,29	83,14	92	74,22	111,44
15	8,102	23,762	41	28,97	54,99	67	51,29	84,57	93	75,49	112,87
16	9,598	25,4	42	30,02	55,51	68	52,15	84,67	94	75,49	114,84
17	9,598	26,306	43	31,675	56,99	69	53,72	86,01	95	75,785	114,84
18	11,177	27,735	44	31,675	58,72	70	54,99	87,48	96	77,16	115,605
19	11,177	28,966	45	32,28	58,84	71	54,99	89,23	97	78,73	116,93
20	12,817	30,017	46	34,05	60,24	72	55,51	89,23	98	79,98	118,35
21	12,817	31,675	47	34,665	61,9	73	56,99	90,37	99	79,98	120,36
22	13,765	32,277	48	34,665	62,81	74	58,72	91,78	100	80,25	120,36
23	14,921	34,048	49	36,03	63,49	75	58,72	93,48	101	81,61	121,06
24	14,921	34,665	50	37,67	64,95	76	58,84	94,23	102	83,14	122,57
25	16,768	36,03	51	37,67	66,76	77	60,24	94,705	103	84,57	123,77

3) Los límites de confianza del 95 % inferior y superior de la curva se pueden calcular a partir de la ecuación:

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \pm R \sqrt{\text{var}C + \text{var}\alpha D^2 + \text{var}\beta D^4 + 2\text{covar}(C, \alpha)D + 2\text{covar}(C, \beta)D^2 + 2\text{covar}(\alpha, \beta)D^3} \quad (7)$$

donde:

R^2 es el factor de confianza de la regresión, y es el límite de confianza del 95 % de una distribución ji al cuadrado, $\chi^2(\text{df}, 95 \%)$, con 2 o 3 grados de libertad (df).

Para una curva lineal cuadrática (df = 3) R^2 vale 7,81, y para una curva lineal, 5,99. En la ecuación (7) hay que utilizar un valor de 2,79, que en el caso de una curva lineal debe ser de 2,45. Dado que tanto en la observación de la producción de dicéntricos como en la curva de calibración se consideran unos límites de confianza del 95 %, algunos autores han propuesto que el límite de confianza de la curva de regresión sea del 83 % en lugar del 95 %, para reducir la posible sobreestimación de la incertidumbre [134, 135]. En este caso, R^2 valdrá 5,02 para la curva lineal cuadrática y 3,54 para la curva lineal.

- 4) El cálculo del punto en el que Y_L interseca la curva de confianza superior, que corresponde al límite de confianza del 95 % inferior de la dosis estimada (D_L), se puede realizar por iteración. A ese efecto se puede utilizar la herramienta de resolución contenida en el programa Excel. Se puede obtener del mismo modo el punto en que Y_U interseca la curva de confianza inferior (D_U). En el ejemplo presente, D_L y D_U valen 0,51 y 0,97 Gy, respectivamente.

Si no se conocen las covarianzas, los límites de confianza se pueden calcular por aproximación con la ecuación (8). La ecuación es válida porque la contribución de las covarianzas a la incertidumbre es relativamente pequeña.

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \pm R\sqrt{\text{var}C + \text{var}\alpha D^2 + \text{var}\beta D^4} \quad (8)$$

Para curvas de calibración bien determinadas sobre la base de un recuento abundante, la varianza debida a la curva es pequeña respecto de la varianza de la producción observada en la persona, y se puede despreciar. Se puede obtener una estimación aproximada más simple de D_L y D_U directamente a partir de la curva de calibración considerando los puntos donde Y_L e Y_U cruzan la línea de trazo continuo de la figura 25.

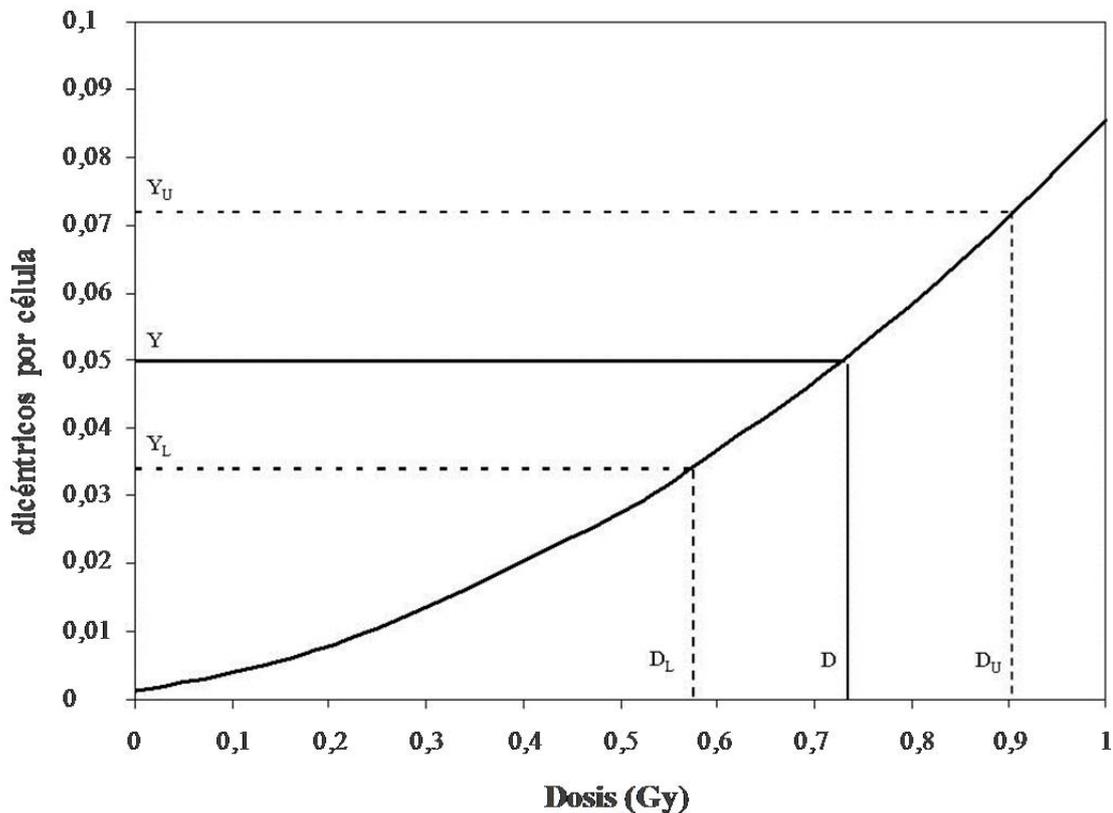


Fig. 25. Curva de calibración dosis-respuesta utilizada para estimar la incertidumbre despreciando el error debido a la curva.

En el ejemplo presente, a 0,73 Gy el error asociado a la curva es de 0,002; el valor se obtiene sustituyendo D por 0,73 Gy en el último término de la ecuación (7). El valor obtenido es menor que el error estándar asociado a la producción de dicéntricos observada $(25)^{1/2}/500$, que vale 0,01. Con este planteamiento, D_L y D_U valen 0,57 y 0,91.

Si la prueba estadística de la u es mayor que 1,96, habría que corregir Y_U y Y_L para tener en cuenta la sobredispersión, multiplicando por el factor que se indica más adelante, donde CL es el límite de confianza de Poisson que figura en las tablas normalizadas, X el número de dicéntricos observados y σ^2/y el índice de dispersión observado:

$$Factor = \left(\frac{CL}{X} \right)^{\sqrt{\sigma^2/y}} \quad (9)$$

Utilizando el ejemplo precedente, si en lugar de 25 células con un dicéntrico se hubieran observado 19 células con un dicéntrico y tres células con dos, σ^2/y valdría 1,19, y el valor de u sería de 3,19. En este caso, Y_U e Y_L valen:

$$Y_U = \frac{36.03}{500} \times \left(\frac{36.03}{25} \right)^{\sqrt{1.19}} = 0,1074 \quad (10)$$

$$Y_L = \frac{16.77}{500} \times \left(\frac{16.77}{25} \right)^{\sqrt{1.19}} = 0,0217 \quad (11)$$

Aplicando estos valores, D_L y D_U valen 0,39 y 1,19 Gy, respectivamente.

9.7.4. Ampliación de los cálculos de la dosis a situaciones de exposición más complejas

La sección precedente se refiere a casos en los que se ha producido una gran sobreexposición aguda y accidental a radiación de baja TLE, que ha afectado uniformemente al cuerpo entero y en la que se dispone con prontitud de una muestra de sangre. La frecuencia de dicéntricos por célula, calculada respecto de una curva de dosis-respuesta aguda obtenida *in vitro*, proporciona una estimación fiable de la dosis promedio absorbida por todo el cuerpo. Sin embargo, en la práctica esas circunstancias ideales rara vez se dan y lo común es que se produzca una irradiación prolongada o fraccionada. Es más usual que las exposiciones accidentales no sean uniformes y que afecten quizás solo a una parte del cuerpo. También puede que se retrase bastante la obtención de una muestra de sangre para realizar el estudio cromosómico. Esos factores hacen que la muestra contenga una población no homogénea de linfocitos y que la producción de dicéntricos resultante, comparada respecto de una curva de dosis-respuesta estándar obtenida *in vitro*, proporcione una estimación no realista de la dosis. La falta de homogeneidad da una producción de dicéntricos que no se ajusta a una distribución de Poisson sino que en general está sobredispersa. En las exposiciones parciales ello se debe, obviamente, a que los linfocitos que se encuentran en los tejidos externos al campo de radiación no habrán sufrido lesiones. Si la exposición está muy localizada, puede que las células dañadas, menos numerosas de lo previsto, contengan cada una varias aberraciones. Incluso si la dosis de radiación es uniforme en la piel, su disminución monótonica con la profundidad del tejido hace que las dosis recibidas por los linfocitos sean diversas. Ese efecto será particularmente marcado para las radiaciones poco penetrantes, pero para las radiaciones muy penetrantes tales como los rayos X de 250 kVp o los rayos gamma de fuentes de ^{60}Co , ^{192}Ir o ^{137}Cs , el efecto será suficientemente pequeño para que los dicéntricos se ajusten aproximadamente a una distribución de Poisson.

La exposición accidental a radiaciones de alta TLE tales como los neutrones también producirá una distribución sobredispersa, dado el modo en que la dosis se deposita a escala celular (véase la sección 3).

El retraso en la obtención de muestras de sangre influirá en la producción de aberraciones, porque las células que contienen aberraciones inestables dejan de estar en circulación y son sustituidas por células nuevas que no contienen dicéntricos.

En esta sección se pretende examinar el modo en que la producción de aberraciones cromosómicas está influido por la falta de homogeneidad de la exposición, el retraso en la obtención de las muestras y la prolongación de la exposición, y la forma en que, de todos modos, se pueden utilizar los datos para obtener una estimación válida de la dosis. También se considera la notificación de emergencias en las que intervienen dosis muy bajas que, por limitaciones estadísticas, puede ser difícil distinguir de las dosis nulas.

En la sección siguiente figuran ejemplos ilustrados para cada situación de exposición de emergencia.

9.7.4.1. Accidente de criticidad

Un accidente de criticidad es aquel en el que el cuerpo resulta irradiado por neutrones y por rayos gamma. Si se conoce la proporción entre las dosis de neutrones y de rayos gamma, información de la que se suele disponer a partir de mediciones físicas, se pueden calcular por iteración las dosis de neutrones y de rayos gamma. El proceso de iteración se realiza del modo siguiente:

- 1) Supongamos que todas las aberraciones se pueden atribuir a los neutrones, y a partir de la producción de dicéntricos medida estimamos una dosis a partir de la curva de neutrones;
- 2) Utilizamos la dosis de neutrones estimada y la proporción entre neutrones y rayos gamma que nos han proporcionado para estimar la dosis de rayos gamma;
- 3) Utilizamos la dosis de rayos gamma para estimar la producción de dicéntricos debida a los rayos gamma;
- 4) Restamos la producción calculada de dicéntricos debida a los rayos gamma de la producción medida, y obtenemos un nuevo valor de la producción debida a los neutrones;
- 5) Repetimos los pasos 1 a 4 hasta obtener unas estimaciones autocoherentes.

Si no se dispone de una estimación física de la proporción entre neutrones y rayos gamma, no se puede aplicar este método. En ese caso, una posibilidad es expresar la dosis en Gy-Eq, como se hizo para las víctimas del accidente de Tokai-mura. Sin embargo, Brame y Groer [136] han descrito un planteamiento bayesiano de la estimación de la dosis en los accidentes de criticidad con el que se puede estimar la dosis aun careciendo de estimación de la proporción. Se ha comprobado que en las simulaciones de accidentes el método bayesiano proporciona resultados muy similares a los obtenidos con el procedimiento clásico de iteración [137].

9.7.4.2. Sobreexposición a dosis bajas

Se afirma a menudo que el límite inferior de detección de la dosis mediante dicéntricos para radiaciones de baja TLE se sitúa alrededor de los 0,1–0,2 Gy. La sensibilidad a las dosis bajas es una función del nivel de fondo de dicéntricos (que para la población general es del orden de 0,5 a 1/1 000 células) y del límite del número (realista) de metafases que se pueden examinar. Por consiguiente, las estimaciones de las dosis bajas van acompañadas de una gran incertidumbre estadística. Como se ha dicho, la incertidumbre procede principalmente del error de Poisson de la producción, pero con una pequeña contribución del error estándar de los coeficientes de la curva de dosis-respuesta, de los que el de α es el más importante a dosis bajas. A efectos prácticos, este último se puede despreciar a menos que los datos de calibración para dosis bajas sean escasos.

Unos 100 a 200 mGy son poco preocupantes en lo que se refiere a las consecuencias de la exposición en la salud, pero en términos legales se trata de una dosis alta si se compara con la dosis ocupacional anual límite de 20 mSv recomendada por la ICRP. A menudo se presiona a la citogenética para resolver casos de presuntas sobredosis bajas, incluso forzando el método más allá de su capacidad.

La experiencia muestra que al notificar los resultados los no especialistas rara vez comprenden el concepto de incertidumbre. Se dispone de cierto número de planteamientos a los que se puede recurrir para facilitar la interpretación de los resultados. En primer lugar, aunque estadísticamente no sea estrictamente exacto, se puede explicar que la probabilidad de que una dosis sea superior al límite de confianza superior del 95 % es solo del 2,5 %. Además, se puede utilizar el límite de confianza inferior para definir el “umbral de detección” de la prueba: con las cifras del cuadro 9, la dosis sería estadísticamente superior a cero Gy solo si hay 4 o más dicéntricos por 1 000 células, es decir, cuando el límite de confianza inferior es mayor que cero Gy.

CUADRO 9. LÍMITES DE CONFIANZA DE LA DOSIS DEL 95 % PARA DIVERSAS PRODUCCIONES BAJAS DE DICÉNTRICOS POR 1 000 CÉLULAS Y RAZÓN DE POSIBILIDADES QUE MUESTRA LA VEROSIMILITUD DE UNA DOSIS NULA O DE 0,25 Gy

(dosis calculadas utilizando $Y = 0,0010 + 0,0164D + 0,0492D^2$)

Observación (dicéntricos)	Dosis (Gy)			Razón de posibilidades p(0 Gy):p(0,25 Gy)
	Límite de confianza inferior	Media	Límite de confianza superior	
0	—	0	0,12	1306 : 1
1	0	0	0,18	160 : 1
2	0	0,05	0,23	20 : 1
3	0	0,09	0,26	2 : 1
4	0,01	0,13	0,30	1 : 3
5	0,03	0,16	0,33	1 : 28
6	0,06	0,19	0,36	1 : 229
7	0,09	0,22	0,38	1 : 1868

Si, como opción alternativa, se consideran solo dos posibles hipótesis (dosis nula o la dosis presunta, por ejemplo, de un dosímetro), se pueden utilizar las probabilidades relativas de cada una de ellas para calcular la razón de posibilidades de las dos dosis. Las probabilidades derivadas de la distribución de Poisson serán las siguientes. Si la dosis era nula, entonces de la curva de dosis-respuesta se prevé una frecuencia de fondo de 1 dicéntrico por cada 1 000 células. Para una dosis de 0,25 Gy, se prevé una producción de 8,2/1 000. A partir de la distribución de Poisson, la probabilidad relativa de no observar ningún dicéntrico cuando se prevén 1 y 8,2 es $e^{-1}/e^{-8,2}$, es decir, 0,36788/0,00027, que da aproximadamente 1 300. En la fila superior del cuadro 9 se indican los valores de la media, los intervalos de confianza inferior y superior para la dosis, y la razón de posibilidades para una dosis nula: dosis de dosímetro, junto con, más abajo, otros valores que se habrían citado si se hubieran observado diferentes cantidades de dicéntricos en 1 000 células.

El laboratorio notificante puede utilizar uno de esos dos planteamientos, o ambos, cuando presente los resultados del análisis, decisión que dependerá de las circunstancias particulares del caso.

9.7.4.3. Exposición parcial del cuerpo

La indicación citogenética de que se ha producido una exposición parcial del cuerpo es que la distribución de dicéntricos entre las segundas metafases del paciente no es de Poisson. Por consiguiente, la primera medida será calcular la razón entre la varianza y la media (σ^2/y) y seguidamente aplicar la prueba de la u para determinar si la razón se desvía significativamente de la unidad (véase la sección 8.3). Si los datos son congruentes con una distribución de Poisson, la recomendación es que se notifique una estimación de la dosis promediada para el cuerpo entero. Si los datos no corresponden a una distribución de Poisson, se han propuesto dos métodos (véase *infra*) mediante los cuales se puede estimar una dosis correspondiente a una exposición parcial, en lugar de limitarse a dar un valor promediado para todo el cuerpo. El incentivo para determinar la estimación de la dosis de exposición parcial del cuerpo se puede basar también en la información sobre las circunstancias en que se ha producido la sobredosis. El método recomendado para evaluar si los datos se ajustan a una distribución de Poisson es la prueba de la u , pero muchos consideran que esa prueba no es muy robusta, especialmente cuando se examina un número reducido de extensiones metafásicas. De ahí que en muchos laboratorios se comparen también sistemáticamente las estimaciones de la dosis para el cuerpo entero así como para exposiciones parciales utilizando uno cualquiera de los dos métodos descritos *infra*. Si la estimación de la dosis para el cuerpo entero difiere significativamente de la estimación para una exposición parcial, el laboratorio debería considerar que el caso puede corresponder a una exposición parcial del cuerpo. Si existe incertidumbre en cuanto a que haya diferencias significativas entre las estimaciones de la dosis para el cuerpo entero o para parte del cuerpo (sección 9.7.3), la recomendación es que se utilicen los dos métodos descritos aquí únicamente cuando los datos correspondan significativamente a una distribución no de Poisson.

Método 1

El método fue propuesto inicialmente por Dolphin [138] y se ha denominado de Poisson contaminado. Estudia la distribución sobredispersa de dicéntricos entre todas las células examinadas. Se considera que la distribución observada es la suma de *a*) una distribución de Poisson que representa la fracción irradiada del cuerpo y *b*) la fracción restante, no expuesta. Obviamente, las células que contengan aberraciones se encontrarán en la parte irradiada del cuerpo. Las células no lesionadas abarcarán dos subpoblaciones: las de la fracción no irradiada y las células irradiadas que no han resultado lesionadas (que corresponderán al primer término (e^{-Y}) de la serie de Poisson). La ecuación (12) describe la distribución del daño entre las células:

$$\frac{Y_F}{1 - e^{-Y}} = \frac{X}{N - n_0} \quad (12)$$

donde:

Y_F es la producción media de dicéntricos en la fracción irradiada,
 e^{-Y} representa el número de células no lesionadas de la fracción irradiada,
 X es el número de dicéntricos observados,
 N es la cifra total de células, y
 n_0 es el número de células que no presentan dicéntricos.

La ecuación (12) se puede resolver por iteración para hallar la estimación más probable de la producción, y a continuación se puede utilizar Y_F para calcular la fracción, f , de células examinadas que habían sido irradiadas, mediante la ecuación (13):

$$Y_F f = \frac{X}{N} \quad (13)$$

La dosis impartida a la fracción irradiada se puede calcular entonces utilizando Y_F y la curva de calibración apropiada. El tamaño de la fracción de cuerpo irradiada se puede obtener de f una vez corregidos los efectos de la mortalidad interfásica y del retraso de la mitosis. Esos factores hacen que la probabilidad de que esas células lleguen a la metafase en un cultivo de 48 horas, incluso aunque no presenten aberraciones, es inferior a la de las células que no han estado expuestas. Si la fracción de células irradiadas que llegan a la metafase es p , la fracción de cuerpo irradiado, F , viene dada por

$$F = \frac{f / p}{1 - f + f / p} \quad (14)$$

El valor de p se estima mediante la ecuación

$$P = \exp(-D/D_o) \quad (15)$$

donde:

D es la dosis estimada, y

se dispone de datos experimentales para los valores de D_o entre 2,7 y 3,5 [139, 140].

El planteamiento presenta, sin embargo, cierto número de limitaciones:

- 1) Da por supuesto que la exposición de la fracción irradiada es homogénea.
- 2) Deduce la fracción de linfocitos irradiados que se pueden relacionar únicamente con la fracción de cuerpo irradiada admitiendo el supuesto simplificador de que los linfocitos se distribuyen uniformemente por todo el cuerpo.
- 3) Requiere una dosis local suficientemente alta para que se observen cierta cantidad de células con dos o más dicéntricos. Es necesario que así sea para calcular el mejor ajuste de las células irradiadas pero no dañadas.
- 4) Da por supuesto que el retraso entre la irradiación y la obtención de la muestra de sangre es mínimo, con lo que la producción de dicéntricos no se diluye significativamente debido a la entrada en la circulación de células recién formadas, que no están lesionadas. Si se produce esa dilución, es probable que la fracción irradiada obtenida con este método constituya una subestimación [141].

Método 2

El método fue propuesto inicialmente por Sasaki y Miyata [142] y se ha denominado método Qdr. En él se considera la producción de dicéntricos y anillos únicamente de las células que contienen aberraciones inestables, y da por supuesto que esas células existían en el momento del accidente. Por consiguiente, el método elude el problema de la dilución por células no dañadas procedentes de una fracción no expuesta del cuerpo o el reemplazo posterior a la irradiación con origen en el conjunto de células madre. Asimismo, no requiere la presencia de células muy lesionadas que contengan dos o más aberraciones. Qdr es la producción prevista de dicéntricos y anillos entre las células dañadas, N_U , y se obtiene de

$$Qdr = \frac{X}{N_U} = \frac{Y_1}{1 - \exp(-Y_1 - Y_2)} \quad (16)$$

donde:

X es la cifra de dicéntricos y anillos, y

Y_1 y Y_2 son las producciones de dicéntricos y anillos más la de acéntricos en exceso, respectivamente.

Dado que Y_1 e Y_2 son funciones conocidas de la dosis y se pueden derivar a partir de curvas de dosis-respuesta obtenidas *in vitro*, Qdr es función únicamente de la dosis, por lo que permite estimar la dosis para la parte irradiada del cuerpo.

El método también presenta varias limitaciones, a saber:

- 1) Da por supuesto, al igual que el método 1, que la exposición de la fracción irradiada es uniforme, si bien, según Sasaki y Miyata [142] no informa sobre el tamaño de esa fracción. De todos modos, el tamaño se puede calcular aplicando esencialmente el mismo procedimiento que con el método 1, es decir, convirtiendo la dosis en producción y utilizando seguidamente las ecuaciones (13) y (14).
- 2) Da por sentado que las aberraciones acéntricas en exceso también tienen distribuciones de Poisson, aunque ello no lo hayan confirmado los datos obtenidos en experimentos *in vitro*. Si esta limitación se considera importante, se puede evitar considerando la producción de dicéntricos y anillos en las células dañadas que contengan únicamente dicéntricos y anillos. La ecuación (16) quedaría reducida entonces a

$$Qdr = \frac{X}{N_U} = \frac{Y_1}{1 - \exp(-Y_1)} \quad (17)$$

que es idéntica a la (12). Esta forma simplificada dará una estimación de la dosis idéntica a la que se obtiene con el método 1.

- 3) En el método se da por sentado que todas las células que contienen aberraciones inestables estaban presentes en el momento de la irradiación, y que no ha habido aporte de células con aberraciones cromosómicas procedentes de lesiones cromatídicas ocurridas en las células madre.

9.7.4.4. Obtención de muestras de sangre con retraso

Se ha documentado fehacientemente que algunos linfocitos portadores de aberraciones siguen presentes en la circulación periférica muchos años después de la irradiación. Sin embargo, se ha demostrado que si las muestras se obtienen unas pocas semanas después de la irradiación, la producción de aberraciones es inferior. Ello se constata particularmente en el caso de dosis grandes, suficientemente altas para causar reacciones deterministas tempranas tales como la disminución del recuento de leucocitos. A dosis bajas, inferiores al umbral del efecto determinista, aumenta la posibilidad de que se reconozca tardíamente una sobredosis. Por consiguiente, es necesario realizar ajustes para que la estimación de la dosis sea más realista. Desafortunadamente, se dispone de pocos datos que posibiliten la deducción de un factor de corrección fiable. En efecto, dadas las destacadas variaciones entre personas, que dependen de factores tales como las infecciones, la disminución de la producción de aberraciones probablemente no se pueda expresar simplemente en forma de una función del tiempo únicamente. Sin embargo, se ha propuesto una tasa de desaparición exponencial, con un semitiempo de alrededor de tres años [106]. Parece una aproximación general adecuada cuando la obtención de la muestra se ha retrasado mucho, por ejemplo, cinco años o más. Sin

embargo, en la investigación de exposiciones accidentales es muy infrecuente que se produzcan retrasos tan grandes. Lo habitual es que se tarde desde unos pocos días hasta unas pocas semanas. Es probable que se produzca un retraso de unas pocas semanas si no se tiene conciencia de la exposición hasta que se procesa un dosímetro personal de uso rutinario y la exposición se ha producido al principio del período examinado. A lo sumo nos podemos encontrar con retrasos del muestreo de hasta un año, y para ese intervalo de tiempo resulta inapropiado un semitiempo de desaparición exponencial de unos tres años.

El conjunto de datos probablemente más completo es el publicado por Buckton *et al.* [63, 143, 144], quienes a lo largo de más de 30 años tomaron muestras repetidamente de un grupo de pacientes con espondilitis anquilosante tratados con dosis fraccionadas de rayos X. En esos estudios se observó una larga meseta inicial en la producción de aberraciones, que duraba alrededor de 20 semanas, seguida de una disminución muy pronunciada que persistía durante más de cuatro años. Calcularon que a lo largo de los primeros cuatro años la producción de dicéntricos descendió a una tasa de aproximadamente un 43 % cada año, y a partir de entonces la disminución fue de alrededor del 14 % cada año. Habida cuenta de la considerable variabilidad de los pocos datos disponibles, no se pueden dar orientaciones firmes, especialmente para los retrasos que superen las pocas semanas. Por consiguiente, en las producciones de dicéntricos no corregidas probablemente se subestimen las dosis, pero el grado de la subestimación dependerá de factores personales, generalmente no cuantificables.

Se señaló al tratar de la irradiación parcial del cuerpo (sección 9.7.4.3) que en el método Qdr se considera la producción de dicéntricos y anillos únicamente en las células dañadas. Por consiguiente, aplicando ese planteamiento cuando hay retraso en la obtención de las muestras se podría también eludir el problema de la dilución con el tiempo causada por el aporte a la circulación de células no dañadas, siempre y cuando se siga observando un número suficiente de células con aberraciones inestables. Obviamente, ello no será posible cuando el retraso sea muy prolongado. En esos casos, sin embargo, se podría considerar la persistencia de células con aberraciones estables. Durante muchos años, el único modo de hacerlo era cariotipar muchas preparaciones teñidas en bloque, y más tarde preparaciones bandeadas. Con esos métodos, el estudio de la espondilitis anquilosante puso de manifiesto que el nivel de esas células se mantenía más o menos constante a lo largo de los 30 años de seguimiento. Awa [145] ha notificado también una buena correlación entre la frecuencia de aberraciones estables y las estimaciones del sistema dosimétrico de 1986 (DS86) en los supervivientes de bombardeos atómicos. Al dividirse, las células que contienen aberraciones inestables son eliminadas selectivamente porque no se produce la disyunción mitótica. El exceso de aberraciones estables con el paso del tiempo se explica suponiendo que las células que contienen lesiones estables desaparecen al mismo ritmo que las que contienen lesiones inestables, pero que la pérdida de las lesiones estables se ve compensada por las divisiones irrestrictas procedentes del conjunto de células madre. El laborioso procedimiento de cariotipaje con bandeado ha sido sustituido actualmente por la técnica de FISH, que se considera un método óptimo para examinar en un gran número de células la presencia de traslocaciones estables infrecuentes, aleatorias y no constitucionales para realizar una dosimetría biológica con carácter retrospectivo. El método se describe en la sección 10.

9.7.4.5. Exposición prolongada y exposición fraccionada

La prolongación o el fraccionamiento de la exposición también pueden hacer que la producción de aberraciones sea menor que si se recibe la misma dosis de forma aguda. Para radiaciones de alta TLE, en las que la relación dosis-respuesta es casi lineal, no cabría prever ningún efecto debido a la tasa de dosis o al fraccionamiento. En cambio, para radiaciones de baja TLE, la prolongación de la dosis disminuye el coeficiente de la dosis al cuadrado, β , en la ecuación de la producción (2). El término corresponde a las aberraciones, posiblemente

debidas a dos trayectorias, que se pueden modificar en virtud de mecanismos de reparación que disponen de tiempo para operar durante el transcurso de la exposición prolongada o en los períodos que median entre exposiciones agudas intermitentes. Cierta número de estudios han demostrado que la disminución de la frecuencia de las aberraciones parece seguir una sola función exponencial con un tiempo medio de alrededor de 2 horas. Cinco o seis horas después de la exposición, la mayoría de las lesiones que dan lugar a aberraciones cromosómicas habrán sido reparadas, o de una u otra manera ya no podrán producir interacciones.

Lea y Catchside [146] propusieron un factor dependiente del tiempo, denominado función G, con el que se puede modificar el coeficiente de la dosis al cuadrado y, de ese modo, se tienen en cuenta los efectos de la prolongación de la dosis. La ecuación lineal cuadrática (2) se puede modificar según se muestra en la ecuación (18):

$$Y = C + \alpha D + \beta G(x) D^2 \quad (18)$$

donde:

$$G(x) = \frac{2}{x^2} [x - 1 + e^{-x}] \quad (19)$$

y

$$x = \frac{t}{t_0} \quad (20)$$

donde:

t es el tiempo durante el cual se produjo la irradiación, y

t_0 es la vida media de las roturas, que, según se ha demostrado, es del orden de ~ 2 horas [96, 147].

Por consiguiente, en el caso de la irradiación continua, es necesario conocer el tiempo que ha durado la exposición y realizar la suposición simplificadora de que la tasa de dosis se ha mantenido más o menos constante durante la exposición. Solo vale la pena intentar este procedimiento si la dosis total que ha intervenido es suficientemente importante y la exposición ha durado desde horas hasta unos pocos días. Obviamente, para exposiciones pequeñas ($<0,3$ Gy) a radiaciones de baja TLE, incluso aunque haya sido aguda, la mayoría de las aberraciones se deben a trayectorias ionizantes únicas, de modo que de todos modos la producción se aproxima a $Y = \alpha D$. Cuando la dosis se aplica durante un período prolongado, $G(x)$ se reduce prácticamente a cero. Por lo tanto, incluso si interviene una dosis alta ($>1,0$ Gy), la producción viene dada, en efecto, por $Y = \alpha D$. En el caso de las exposiciones breves e intermitentes, con intervalos entre fracciones de más de seis horas, las exposiciones se pueden considerar irradiaciones agudas separadas, y las distintas producciones de aberraciones inducidas se suman. Para intervalos entre fracciones más breves, en la ecuación (18) $G(x)$ se puede sustituir por $\exp(-t_1/t_0)$, donde t_1 es el tiempo que media entre las fracciones. Lloyd *et al.* [96] y Bauchinger *et al.* [147] han presentado datos experimentales que respaldan la hipótesis de la función G.

9.7.4.6. Incorporación interna de radionucleidos

Se trata de un tipo particular de irradiación prolongada, con la complicación añadida de que la exposición del cuerpo es muy desigual. La razón de ello es que los sitios de deposición de los radionucleidos y su tiempo de permanencia dependen de un gran número de factores. Entre ellos se cuentan la vía de entrada en el cuerpo, la forma fisicoquímica, la calidad de la radiación emitida, la vía metabólica a la que se puede haber incorporado el radionucleido, y el estado fisiológico de la persona.

En los linfocitos obtenidos de personas con contaminación interna se pueden observar aberraciones cromosómicas en exceso respecto del nivel de fondo. Sin embargo, debido a los numerosos factores de confusión que intervienen, no se puede utilizar la producción de aberraciones para deducir una estimación válida de la dosis de radiación impartida al cuerpo entero o a órganos concretos. Se puede referir la producción de aberraciones a una curva de dosis-respuesta obtenida irradiando linfocitos *in vitro* con el radionucleido de que se trate, y así realizar una estimación de la dosis impartida *in vivo* a los linfocitos circulantes del paciente. DuFrain *et al.* [148] presentaron un ejemplo al respecto para un accidente en el que un hombre resultó contaminado cuantiosamente con ^{241}Am . Sin embargo, la dosis impartida a los linfocitos puede representar muy incorrectamente la dosis impartida a otras células o tejidos del cuerpo, en particular en el caso de los emisores alfa.

Por consiguiente, en general, los estudios citogenéticos tienen poco valor en los casos de incorporación interna de radionucleidos. Existen excepciones cuando los radionucleidos se dispersan de forma bastante uniforme por el cuerpo. Valen de ejemplo los isótopos del cesio y el agua tritiada. El cesio tiende a concentrarse en el tejido muscular, que presenta una distribución más bien ubicua, y tiene una eliminación biológica con dos máximos: uno durante los dos primeros días y el segundo durante los 100 días siguientes. ^{137}Cs fue el nucleido liberado a la comunidad en el accidente de Goiânia [149, 150] y uno de los principales contribuyentes a la dosis que causó la contaminación ambiental en Chernóbil [151]. El tritio incorporado en forma de gas o agua tritiada pasa al agua del cuerpo y provoca una irradiación más o menos uniforme. Su período de semieliminación biológica es de alrededor de 10 días, por lo que, igual que ocurre con el cesio, la exposición se podría considerar crónica y, en la práctica, cabría prever una relación dosis-respuesta lineal. Si se carece de una curva de dosis-efecto *in vitro* específica para el tritio, bastará una curva para rayos X de alrededor de 200–300 kVp. Prosser *et al.* [152] han demostrado una EBR de 1,13 a dosis, o tasas de dosis, bajas para el tritio respecto de rayos X de 250 kVp.

9.7.5. Ejemplos de estimaciones de dosis

9.7.5.1. Exposición aguda del cuerpo entero

Brewen *et al.* [91] y Preston *et al.* [153] describieron un accidente en el que intervino una fuente de ^{60}Co y que entrañó la irradiación de la parte anterior del cuerpo de forma bastante homogénea con una dosis alta. La parte posterior recibió una dosis media inferior, pero también quedó expuesta cuando el hombre se dio la vuelta y se alejó de la fuente caminando. El tiempo total de exposición fue inferior al minuto. Se tomaron cierto número de muestras de sangre a distintos intervalos, desde seis horas hasta tres años después del suceso. La producción de aberraciones se mantuvo bastante constante desde las 6 horas hasta los 32 días, período de tiempo determinado durante el cual se tomaron 7 muestras de sangre, analizándose 300 metafases en cada una de ellas. Combinando los datos de las 7 muestras se observaron 478 dicéntricos y anillos en 2 100 células. Se utilizó una curva de dosis-respuesta para rayos gamma *in vitro* en la que la dosis D se expresó en roentgen (R):

$$Y = 3,93 \times 10^{-4} D + 8,16 \times 10^{-6} D^2 \quad (21)$$

estimándose una exposición media del cuerpo entero de 144 R (1 R = 0,0095 Gy). El valor concordaba bien con la estimación física de 127 R realizada a partir de un dosímetro de termoluminiscencia que llevaba el operario y de la reconstrucción del suceso con un maniquí. Los cambios hematológicos generales constatados también se correspondían con una exposición de alrededor de 150 R.

9.7.5.2. Accidente de criticidad

Considérese un accidente de criticidad en el que se examinan 100 células y se observan 120 dicéntricos, es decir, 1,2 dicéntricos por célula. La razón entre neutrones y rayos gamma proporcionada por las mediciones físicas es de 2:3 en la dosis absorbida. Las estimaciones citogenéticas de la dosis se tienen que realizar utilizando curvas de calibración para neutrones del espectro de fisión de 0,7 MeV y rayos gamma de ^{60}Co . Las ecuaciones de producción para esas curvas son las siguientes:

$$\text{Neutrones: } Y = 0,0005 + 8,32 \times 10^{-1} D \quad (22)$$

$$\text{Rayos gamma: } Y = 0,0005 + 1,64 \times 10^{-2} D + 4,92 \times 10^{-2} D^2 \quad (23)$$

Siguiendo los pasos enumerados en la sección 9.7.4.1:

- 1) 1,20 dicéntricos por célula equivalen a 1,44 Gy de neutrones;
- 2) $1,44 \times 3/2 = 2,16$ Gy de rayos gamma;
- 3) 2,16 Gy de rayos gamma equivalen a 0,266 dicéntricos por célula;
- 4) $1,20 - 0,266 = 0,934$, que es la producción de dicéntricos atribuible a los neutrones;
- 5) 0,934 dicéntricos por célula equivalen a 1,12 Gy de neutrones.

Repitiendo el paso 2, $1,12 \times 3/2 = 1,683$ Gy de rayos gamma, etc. Después de realizar unas pocas iteraciones se obtienen las dosis de 1,21 Gy de neutrones y 1,82 Gy de rayos gamma. En el cuadro 10 figura la secuencia entera.

Se ha descrito una validación *in vitro* de este planteamiento, con la que se han obtenido estimaciones muy buenas de las dosis reales en ejercicios internacionales llevados a cabo para comparar la dosimetría de los accidentes de criticidad [137, 154]

CUADRO 10. SECUENCIA DE PASOS UTILIZADOS EN LA ESTIMACIÓN DE LA DOSIS DE IRRADIACIONES MIXTAS DE RAYOS GAMMA Y NEUTRONES

Pasos 1 y 5	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Dosis de neutrones	Dosis de rayos gamma	Producción de los rayos gamma	Producción de los neutrones
(Gy)	(Gy)	(dicéntricos por célula)	(dicéntricos por célula)
1,44	2,16	0,266	0,934
1,12	1,68	0,167	1,032
1,24	1,86	0,201	0,999
1,20	1,80	0,189	1,011
1,21	1,82	0,194	1,006

9.7.5.3. Sobreexposición a dosis bajas

Un técnico radiográfico de ensayos no destructivos que trabajaba con fuentes de ^{192}Ir devolvió un dosímetro de termoluminiscencia que había registrado una exposición a radiación penetrante de 250 mSv. En ninguno de los dosímetros de los compañeros que habían trabajado habitualmente con el técnico se registraron exposiciones. No había datos sobre fallos en el sistema ni ninguna otra explicación para la sobredosis registrada en el dosímetro. Se sometió el caso a análisis citogenético, en el que se examinaron 1 000 metafases, ninguna de las cuales presentaba lesiones. Se notificó que la mejor estimación era una dosis nula, pero utilizando la $Y = 0,001 + 0,0164D + 0,0492D^2$, el valor nulo entrañaba un límite de confianza superior del 95 % de 0,12 Gy. Los investigadores albergaban dudas de que el técnico hubiera realmente sido irradiado, por lo que en este caso resultó útil presentar los resultados de un modo distinto. Aplicando el planteamiento de la razón de posibilidades descrito en la sección 9.7.4.2, las posibilidades en favor de la dosis nula eran aproximadamente de 1300:1.

9.7.5.4. Exposición aguda no uniforme

Se produjo una irradiación no homogénea, que dio lugar a una exposición muy localizada suficiente para provocar quemaduras en la piel, cuando un trabajador no expuesto a la radiación recogió una fuente de ^{192}Ir de 250 GBq (6,7 Ci) y se la metió en el bolsillo [155]. Se tomaron rápidamente muestras de sangre y se examinaron mil metafases de linfocitos, 99 de las cuales contenían las aberraciones inestables siguientes: 86 dicéntricos, 2 anillos céntricos y 60 acéntricos en exceso. La distribución de dicéntricos fue como sigue:

CUADRO 11. DISTRIBUCIÓN DE DICÉNTRICOS TRAS UNA EXPOSICIÓN AGUDA NO UNIFORME

	Dicéntricos por célula					
	0	1	2	3	4	5
Nº de células	932	56	9	1	1	1

Las curvas de dosis-respuesta *in vitro* del laboratorio que se ocupó de la investigación fueron:

$$Y_{\text{dicéntricos}} = 1,57 \times 10^{-2} D + 5,00 \times 10^{-2} D^2 \quad (24)$$

$$Y_{\text{acéntricos}} = 2,30 \times 10^{-2} D + 3,90 \times 10^{-2} D^2 \quad (25)$$

Aplicando el método de Poisson contaminado (sección 9.7.4.3, método 1) la estimación más probable de la producción de dicéntricos, Y_F , de las células irradiadas se obtiene introduciendo los datos del ejemplo en la ecuación (12). Por iteración, $Y_F = 0,489$ dicéntricos por célula irradiada, lo que en la curva de dosis-respuesta corresponde a 2,97 Gy.

El tamaño de la fracción irradiada, f , se obtiene resolviendo la ecuación (13), que en este ejemplo da $f = 0,176$. Dado que ese valor corresponde a la población de células que fueron irradiadas y sobrevivieron, se debe ajustar según se describe en la ecuación (14) para tener en cuenta la selección de células irradiadas debida a factores tales como la muerte interfásica y el retraso de la mitosis. Según algunos datos experimentales [147], esa selección es una función exponencial de la dosis, en la que $D_0 = 2,70$ Gy. En el presente ejemplo, la dosis, estimada en alrededor de 3,0 Gy, significaría que solo alrededor del 33 % de las células irradiadas (p en la ecuación (14)) sobrevivieron y pudieron ser analizadas. La fracción originalmente expuesta, F , es igual a 0,393 y se obtiene resolviendo la ecuación (14). Por consiguiente, redondeando, la fracción del cuerpo irradiada fue de alrededor del 40 %, con una dosis promedio de alrededor de 3,0 Gy.

Hay que señalar que en el método de Qdr (sección 9.7.4.3) el laboratorio que realizó la investigación por regla general no utilizaba la producción de dicéntricos y anillos en la estimación de la dosis, sino únicamente la de los dicéntricos, es decir, Qd. Dado que es muy infrecuente que entre las aberraciones se observen anillos, en comparación con los dicéntricos y los acéntricos en exceso, la modificación tiene un efecto meramente trivial. Por lo tanto, si se introducen los valores en la ecuación (16) y se omiten los anillos céntricos se obtiene

$$Qd = \frac{86}{99} = \frac{1,57 \times 10^{-2} D + 5,00 \times 10 \times 10^{-2} D^2}{1 - e^{-3,87 \times 10^{-2} D - 8,90 \times 10^{-2} D^2}} \quad (26)$$

La ecuación se puede resolver para D por iteración y se obtiene una estimación de la dosis de 3,19 Gy. Ese valor concuerda bien con el valor de 2,97 Gy obtenido con el método de Poisson contaminado.

9.7.5.5. Obtención de muestras de sangre con retraso

Se presentan a continuación dos ejemplos de cálculo de la dosis cuando las muestras de sangre se han obtenido con retraso.

Ajuste de la producción de dicéntricos

Stephan *et al.* [156] han notificado un accidente en el que dos hombres fueron expuestos de modo bastante uniforme durante alrededor de cinco minutos a una fuente de rayos gamma de ^{60}Co . Portaban placas de película que indicaron 470 y 170 mSv, valores que coincidían bien con los cálculos físicos de las dosis. Desafortunadamente, la obtención de las muestras de sangre se retrasó 215 días en el caso del hombre más expuesto y 103 días en el de su compañero. Se examinaron alrededor de 1 500 metafases de cada hombre y se obtuvieron producciones de dicéntricos casi idénticas, de 0,47 y 0,46 dicéntricos por 100 células, que corresponden a 0,13 Gy en la curva de dosis-respuesta:

$$Y = 3,00 \times 10^{-4} D + 5,00 \times 10^{-6} D^2 \quad (27)$$

Los autores optaron por ajustar las producciones de dicéntricos $\times 3$ y $\times 2$, respectivamente, para tener en cuenta los retrasos. La decisión se basó en los datos de Brewen *et al.* [91] y Preston *et al.* [153] correspondientes a la irradiación accidental de todo el cuerpo descrita en la sección 9.7.5.1. Las producciones de dicéntricos ajustadas dieron unas estimaciones de la dosis de 0,31 y 0,22 Gy. Aunque de este modo la estimación biológica de la dosis correspondiente al hombre más expuesto se aproxima a la estimación física, sigue habiendo cierta discrepancia. Si los autores hubieran optado por utilizar los datos de retraso del estudio de la espondilitis anquilosante [143], habría correspondido a lo sumo una corrección de 1,4, con lo que la discrepancia entre las estimaciones biológica y física para el primer hombre habría sido mayor. Dado que el efecto de la espondilitis dura hasta 20 semanas, el retraso de 103 días no habría precisado corrección.

Uso del método Qdr

Ishihara *et al.* [157] han descrito un importante accidente en el que se llevó a una vivienda una fuente de ^{192}Ir para radiografía industrial, resultando irradiadas seis personas. Los cuerpos de las dos personas sobreexpuestas más gravemente sufrieron una irradiación parcial, circunstancia que se puso de manifiesto en forma de quemaduras de la piel. También se plasmó en los datos sobre aberraciones, siendo las dosis estimadas por el método Qdr de 1,95 y 1,50 Gy, sustancialmente más altas que los valores de 1,52 y 0,54 Gy de las dosis para el cuerpo entero, respectivamente, obtenidas a partir de las producciones de dicéntricos y anillos por célula. Los valores de dicéntricos y anillos por célula variaron en cierta medida durante los dos primeros meses que siguieron a la exposición, pero luego se hicieron más estables hasta los seis meses. Por el contrario, los valores Qdr se mantuvieron relativamente constantes desde el principio hasta 400 y 200 días, respectivamente, cuando cesaron los estudios.

9.7.5.6. Exposición prolongada y exposición fraccionada

En diciembre de 1998 se produjo un importante accidente en Estambul cuando en una chatarrería se rompió y se abrió una antigua fuente de ^{60}Co para radioterapia [158]. Resultaron irradiadas diez personas, la mayoría durante un día, con tiempos de exposición de entre 2 y 7 horas [159]. Utilizamos aquí a una de las personas a modo de ejemplo. El tiempo de exposición fue de 7 horas, y la frecuencia de dicéntricos, obtenida a partir de los resultados combinados de cuatro laboratorios, fue de 157 dicéntricos en 688 células = $0,228 \pm 0,18$ dic/cél. De la curva de dosis-respuesta

$$Y = 0,001 + 0,003D + 0,060D^2 \quad (28)$$

la estimación de la dosis aguda ($\pm\text{SE}$) = $1,7 \pm 0,1$ Gy. Se ha simplificado ligeramente la incertidumbre despreciando los errores que pueda haber en la curva de dosis-respuesta. Aplicando la función G, en la que

$$x = \frac{t}{t_0} = \frac{7}{2} = 3,5 \quad (29)$$

de modo que $G(x) = 0,413$, la curva de dosis-respuesta se convierte ahora en

$$Y = 0,001 + 0,003D + 0,025D^2 \quad (30)$$

La frecuencia de dicéntricos corresponde ahora a una exposición de 7 horas a $2,5 \pm 0,1$ Gy.

9.7.5.7. Incorporación interna de radionucleidos

Lloyd *et al.* [160] describen la inhalación accidental de alrededor de 35 GBq (~ 1 Ci) de gotículas de agua tritiada por la trabajadora de una fábrica. Se aceleró la eliminación del tritio del cuerpo mediante diuresis forzada. Se calculó la dosis comprometida impartida a los tejidos blandos midiendo la concentración y la tasa de eliminación del tritio por la orina. Se midió la producción de dicéntricos en muestras de sangre obtenidas en diversos momentos después del suceso, y se utilizaron los datos de los días 40 a 50 a efectos de la dosimetría biológica, pues para entonces ya se habían recibido todas las dosis comprometidas. Las producciones de dicéntricos se refirieron a un coeficiente lineal *in vitro* de calibración dosis-respuesta, $5,37 \times 10^{-2}D$, obteniéndose una estimación de la dosis promedio impartida a los linfocitos de 0,58 Gy, valor que, además, había que multiplicar por un factor de 0,66. En el cálculo de ese factor se tienen en cuenta las diferencias de contenido de agua del cuerpo entero, los tejidos blandos y los linfocitos. La producción de aberraciones se calibra respecto de la dosis impartida a los linfocitos, mientras que las dosis aplicadas por el agua tritiada afectan principalmente a los tejidos blandos del cuerpo. La corrección dio una estimación de la dosis biológica de 0,38 Gy, con unos límites de confianza del 95 % de 0,48 y 0,28 Gy, lo que constituye una comparación más realista respecto de los $0,47 \text{ Gy} \pm 20\%$ obtenidos en las mediciones de la orina. Asimismo, convirtiendo la concentración de tritio en la orina a dosis aplicada a los tejidos blandos se tenía en cuenta el contenido de agua de los tejidos blandos [160].

10. ANÁLISIS DE TRASLOCACIONES

Uno de los inconvenientes reconocidos de las pruebas de dicéntricos y de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) es que las lesiones son inestables y, por consiguiente, se eliminan del conjunto de linfocitos de la sangre periférica al ritmo con que se renuevan las células (véase la sección 4). Se admite desde hace tiempo que para realizar la dosimetría biológica de exposiciones antiguas o prolongadas es necesario analizar lesiones más persistentes, por ejemplo, las traslocaciones estables. Las traslocaciones se pueden detectar mediante cariotipaje, pero el método es demasiado laborioso para aplicarlo sistemáticamente en dosimetría biológica. La introducción de la técnica FISH [161] ha abierto la posibilidad de detectar las traslocaciones por otros procedimientos.

En esa técnica se utilizan secuencias específicas de ADN, que se aplican a modo de sondas de una parte concreta del genoma y que, unidas a diversos fluorocromos, destacan o “pintan” las regiones de distintos colores. Las traslocaciones se observan al microscopio de fluorescencia en forma de reordenaciones coloreadas (figuras 26 y 27).

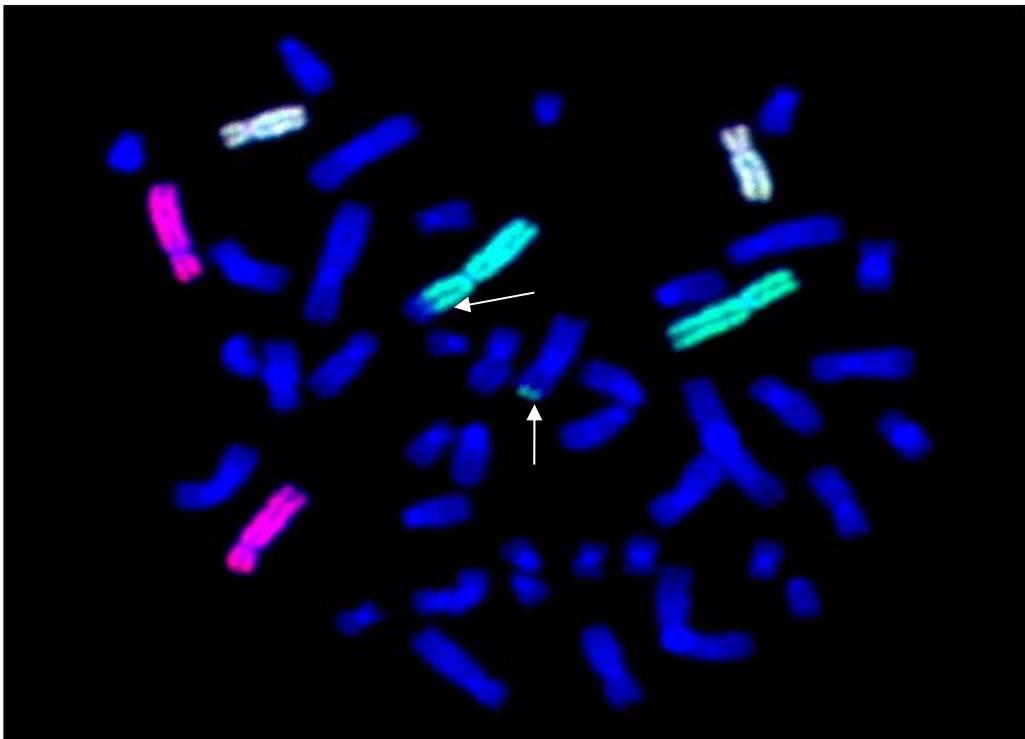


Fig. 26. Metafase humana con cromosomas pintados de colores (Nº 2, FITC, verde; Nº 4, rojo Texas; y Nº 8, FITC + rojo Texas y amarillo), y el resto contrateñido con DAPI. Se observa una traslocación aparentemente simple, o traslocación bidireccional $[t(Ba),t(Ab)]$ que afecta al cromosoma Nº 2.

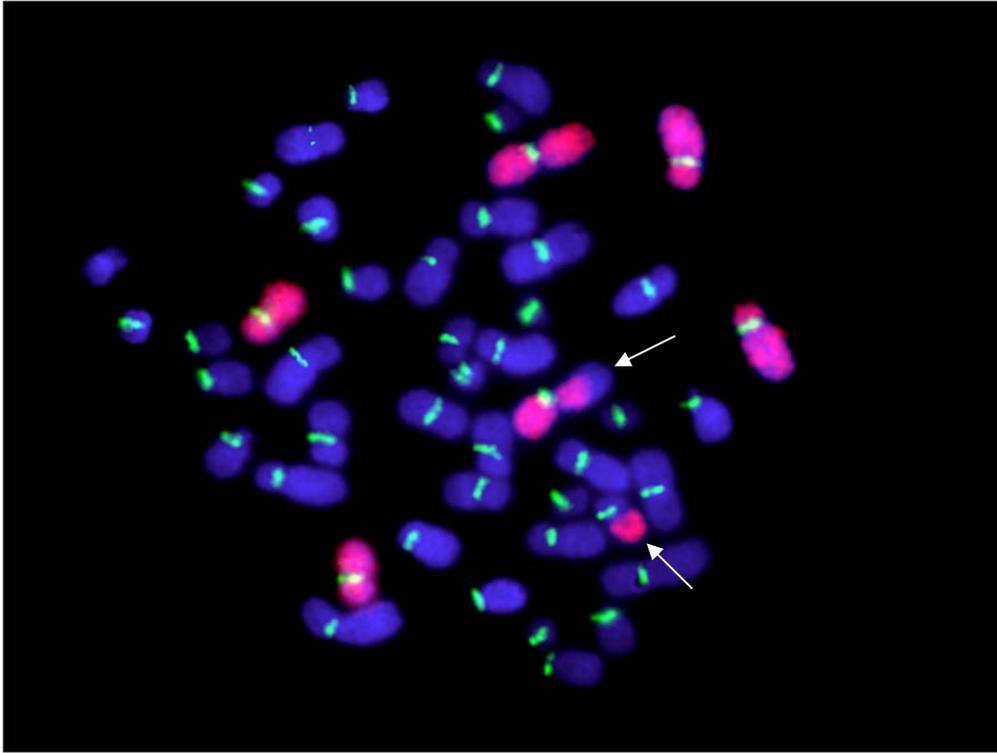


Fig. 27. Metafase humana con cromosomas a los que se les ha aplicado una pintura monocromática (Nº 1, Nº 4 y Nº 11 marcados con Cy3 (rojo)), centrómeros destacados con una sonda pancentromérica marcada con FITC (verde), y el resto contrateñido con DAPI. Se observa una traslocación aparentemente simple, o traslocación bidireccional [t(Ba),t(Ab)] que afecta al cromosoma Nº 1.

La técnica FISH tiene numerosas aplicaciones en medicina y en citogenética fundamental. Sin embargo, en la presente publicación se comentará únicamente su aplicación en dosimetría biológica. Se dispone en la actualidad de una gran variedad de sondas, por lo que se pueden pintar selectivamente regiones enteras o delimitadas de cada uno de los cromosomas humanos. Adhiriendo diferentes proporciones de fluorocromos a puntos específicos se pueden iluminar simultáneamente distintas regiones con una amplia variedad de colores. Un inconveniente del uso de muchos colores, como ocurre en el procedimiento FISH multicolor (mFISH), es que las diferencias pueden ser demasiado sutiles para distinguirlas a simple vista. De ahí que sea necesario utilizar sistemas electrónicos para captar las imágenes y mostrarlas con colores falsos (figuras 28 y 29).

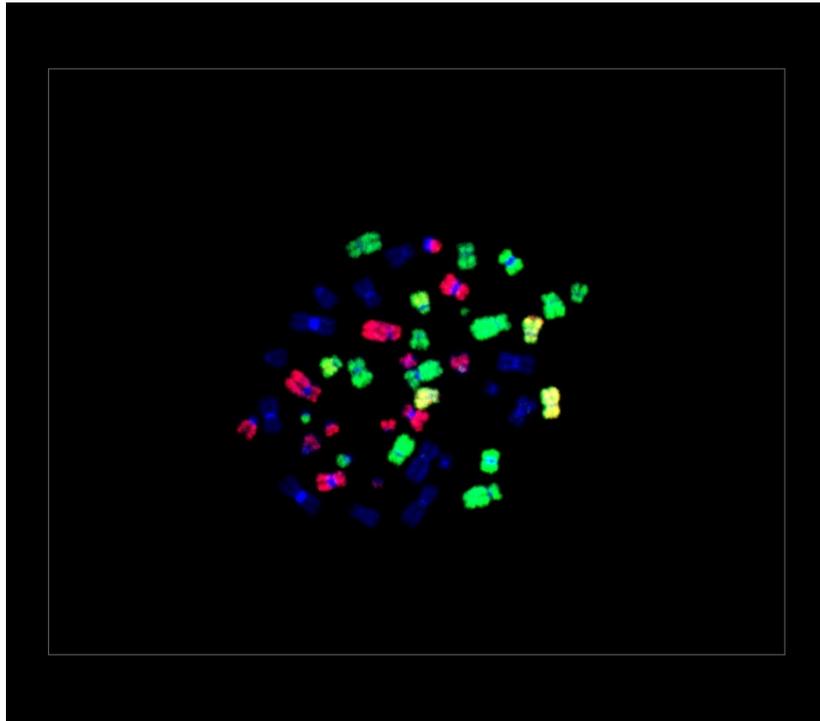


Fig. 28. Imagen de una metafase teñida con mFISH. A: con colores RGB, tal como los ha captado la cámara.

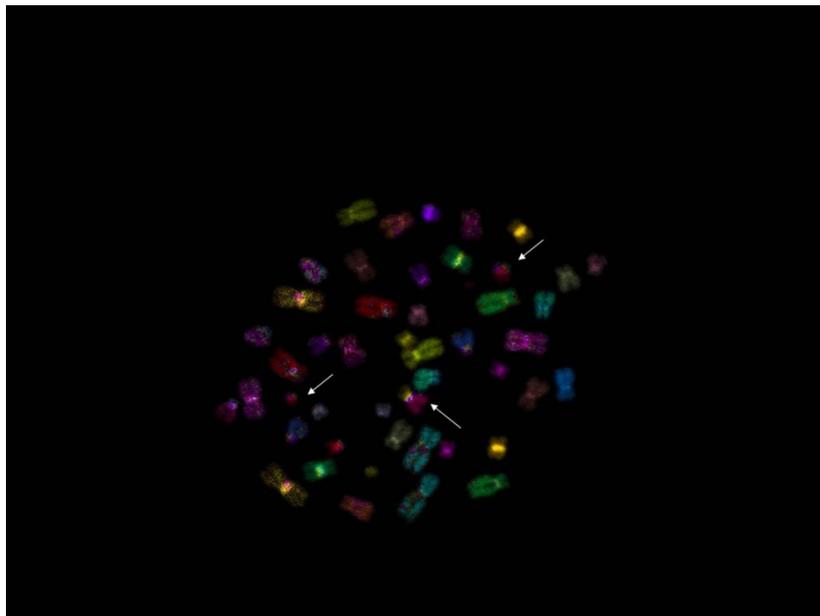


Fig. 29. Imagen de una metafase teñida con mFISH. B: la misma metafase, en la que ahora a cada pareja de cromosomas se le ha asociado un pseudocolor.

10.1. CULTIVO CELULAR Y PROCEDIMIENTOS DE FIJACIÓN

Los procedimientos para obtener sangre, cultivar los linfocitos y recolectar células fijadas son similares a los descritos para la prueba de dicéntricos (secciones 9.1 y 9.2). Si bien las traslocaciones son estables a lo largo de las mitosis, sigue siendo una buena práctica realizar el análisis con metafases M1. Ello es particularmente importante porque la pérdida mitótica de células que contienen aberraciones inestables podría distorsionar la frecuencia media de traslocaciones. Además, puede que en ocasiones para una misma muestra sea necesario

disponer a la vez de las frecuencias de traslocaciones estables y de dicéntricos, inestables. Para el análisis FISH es mejor conservar suspensiones refrigeradas de células fijadas. Se pueden guardar las células preparadas en portaobjetos de microscopio. Habría que mantenerlas a -20°C, pero incluso así en ocasiones se ha constatado un deterioro. Para el transporte a otros laboratorios son más prácticas las suspensiones de células fijadas.

En general, para la dosimetría biológica se pinta únicamente una porción del genoma (es decir, tres parejas de cromosomas), lo que obliga a examinar más metafases de las necesarias para el análisis de dicéntricos. Por consiguiente, es útil y más costoeficaz obtener preparaciones que presenten cada una un gran número de metafases de calidad suficiente para el examen.

10.2. PINTURA DE LOS CROMOSOMAS

Con la gran variedad de sondas y combinaciones de fluorocromos disponible en el comercio se pueden ahora iluminar todos los cromosomas con el método denominado FISH multicolor (mFISH) [162]. Con ese método se puede realizar un cariotipado completo y detectar la totalidad de las traslocaciones intercromosómicas. También se pueden marcar separadamente los centrómeros y los telómeros de todos los cromosomas.

Se pueden detectar los intercambios intracromosómicos tales como las inversiones pericéntricas pintando selectivamente con colores distintos los brazos p y q del cromosoma [163], y las reordenaciones dentro de un mismo brazo se pueden detectar con un bandeo multicolor (mBAND) [164, 165]. Se ha propuesto que el aumento de la frecuencia de intercambios intracromosómicos respecto de los intercambios intercromosómicos es una “huella” de los efectos de las radiaciones de alta TLE [166], de ahí que estos métodos tengan una particular aplicación en la búsqueda de efectos cualitativos de la radiación.

Para la mayoría de las aplicaciones de la dosimetría biológica retrospectiva basta con detectar las traslocaciones intercromosómicas, y el procedimiento mFISH es la técnica que puede proporcionar la mayor cantidad de información de cada metafase. Asimismo, se puede ampliar de modo que todos los brazos cromosómicos se tiñan de un color distinto (pq-mFISH) [167], pero el procedimiento es caro y lento y obliga a recurrir a sistemas complejos de captura y manipulación de imágenes. De ahí que se prefiera pintar un número reducido de parejas de cromosomas, ya sea con un mismo color o con colores distintos, y contrañer el resto de los cromosomas. Se recomienda aplicar una sonda pancentromérica [168] simultáneamente a la pintura de los cromosomas enteros para distinguir con mayor exactitud los dicéntricos y las traslocaciones (figura 30).

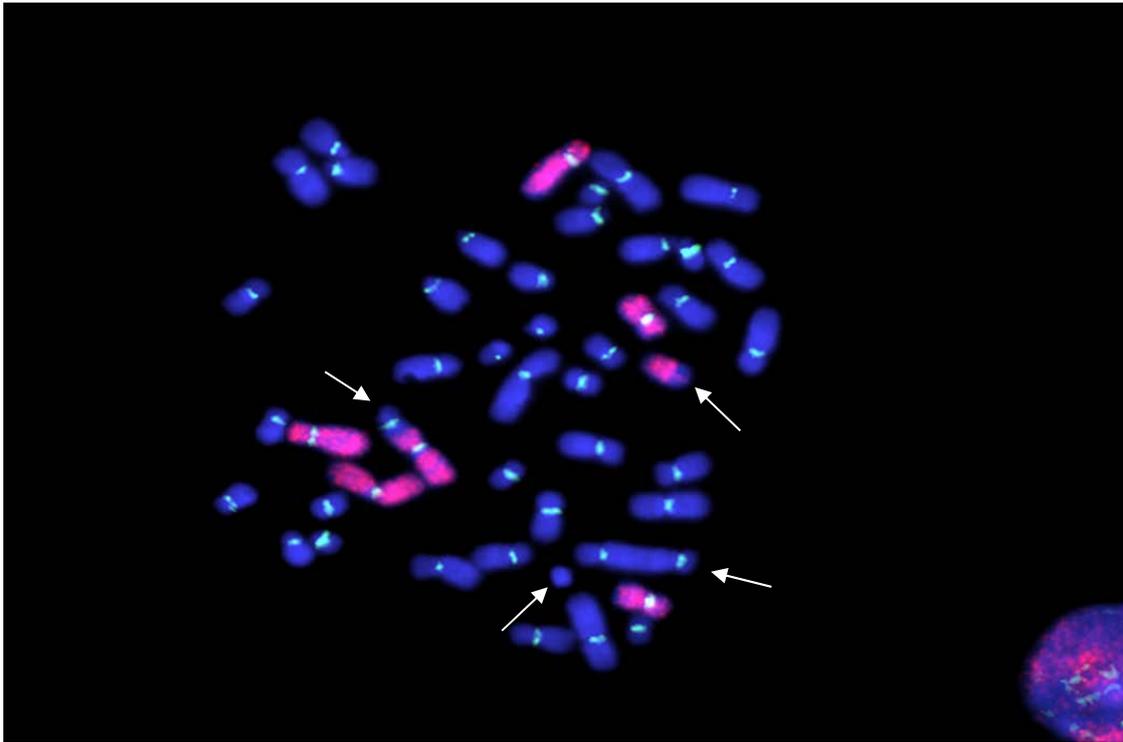


Fig. 30. Metafase humana con cromosomas a los que se les ha aplicado una pintura monocromática (Nº 1, Nº 4 y Nº 11 marcados con Cy3 (rojo)), centrómeros destacados con una sonda pancentromérica marcada con FITC (verde), y el resto contrateñido con DAPI. Se observa un dicéntrico aparentemente simple [dic(BA),ace(ab)] que afecta al cromosoma Nº 1. También se distinguen un dicéntrico y un acéntrico que afectan a los cromosomas contrateñidos.

En general, la pintura de tres de los cromosomas de más tamaño (es decir, los Nº 1 a Nº 12 — véase la figura 7), lo que corresponde a alrededor del 20 % del genoma (véanse los cuadros 2 y 3), detecta las traslocaciones con una eficiencia del 33 % cuando se utiliza solo un color. El porcentaje de genoma “pintado” por cada combinación, respecto del total del genoma, se calcula a partir de la longitud física de los cromosomas [169]. El total de las frecuencias de traslocación genómica se puede estimar según una fórmula estándar propuesta por Lucas *et al.* [170], que se aplica admitiendo el supuesto de que los intercambios son emparejamientos simples. Es aconsejable no incluir los cromosomas 7 y 14 en las combinaciones de sondeo, porque durante el desarrollo inmunológico pueden aparecer *in vivo* traslocaciones y otras aberraciones en las que intervengan esos cromosomas, lo que confundiría la cuantificación del efecto de la radiación [171, 172].

A efectos de dosimetría biológica retrospectiva parece bastar la técnica FISH monocromática para una combinación triple de cromosomas diana. La pintura del triplete con varios colores aumenta la eficiencia de la detección (si se marcan los cromosomas Nº 1, Nº 4 y Nº 12 entre alrededor del 31 % y alrededor del 34 %) y mejora la detección de las traslocaciones complejas que pueden aparecer como consecuencia de exposiciones a dosis altas recientes. Las ecuaciones, que se facilitan en la sección 10.4 para obtener la equivalencia del genoma entero, se pueden aplicar tanto si en la pintura se utiliza un solo color como si se utilizan varios.

10.3. CRITERIOS DE EXAMEN

10.3.1. Selección de las células objeto de examen

Aunque no se ha llegado a un consenso sólido acerca de las metafases que deben ser objeto de examen, se considera que las células metafásicas bien extendidas son adecuadas si parecen

intactas, los centrómeros son morfológicamente detectables y están presentes en todos los cromosomas pintados, y el marcaje con fluorocromo es suficientemente destacado para que se detecten todos los intercambios entre los cromosomas marcados con colores distintos [107].

No se tiene en cuenta sistemáticamente la integridad de los cromosomas contrateñidos, pero la mayoría de los investigadores rechazarían las metafases en las que manifiestamente falten varios cromosomas, por ejemplo, si se presentan menos de 40 objetos.

Algunos investigadores consideran que habría que examinar todo el material pintado presente, aunque ello obligue a aplicar cierto grado de discernimiento, porque el límite de resolución de la técnica FISH actual se sitúa en alrededor de 11–15 Mbp [173]. En efecto, si bien algunas traslocaciones simétricas tienen el aspecto de intercambios incompletos, las investigaciones con sondas para telómeros han mostrado que una gran parte de las traslocaciones que aparentemente son incompletas en realidad son completas [62]. Las células en las que manifiestamente falte una gran parte del material pintado, o centrómeros marcados, se deberían excluir del examen.

A efectos de dosimetría retrospectiva, se ha demostrado que las frecuencias de las traslocaciones en células estables, definidas como células en las que no hay dicéntricos, anillos céntricos o acéntricos, se mantienen constantes a lo largo del tiempo [64, 174]. Por consiguiente, se recomienda anotar para cada traslocación si se ha dado en una célula estable o inestable.

10.3.2. Nomenclatura y registro de los datos

Para describir las aberraciones cromosómicas detectadas con el procedimiento de pintando se han elaborado dos sistemas independientes de nomenclatura, y se utilizan también descripciones basadas en la terminología de los exámenes citogenéticos sistemáticos [173, 175–178]. La introducción de sistemas de nomenclatura respondió al hecho de que la terminología convencional resultó inadecuada para el análisis parcial del genoma, pues muchas configuraciones reveladas con FISH eran más complejas de lo que se preveía.

- i) Se elaboró un sistema (denominado PAINT) con el que meramente se describen los distintos objetos metafásicos pintados que presentan aberraciones [175]. Cada objeto se describe por separado, sin referirse a los demás objetos aberrantes de la célula. Los colores se designan por medio de letras, empezando por orden alfabético con la contracoloración. Una letra mayúscula indica que el componente presenta centrómero. De este modo, utilizando pintura monocromática, un objeto t(Ab) indicaría que se trata de un elemento bicolorado integrado por una porción centromérica de un cromosoma contrateñido y una porción no centromérica de un cromosoma pintado. En cambio, t(Ba) indicaría un objeto portador de un centrómero en el componente pintado. La coloración múltiple se indica agregando letras adicionales a la designación. El lector encontrará en Tucker *et al.* [175] la descripción completa de todas las abreviaciones utilizadas en el sistema. La propuesta adicional formulada en el documento de que se cuenten las uniones de colores a modo de índice de daño relacionable con la dosis no tiene aplicación práctica en dosimetría retrospectiva.
- ii) Savage y Simpson (S&S) [176, 177] propusieron una terminología a base de cifras y letras con la que se describe enteramente cada intercambio. Las cifras indican el número de objetos que contienen material pintado, y la ordenación alfabética de letras plasma en qué medida se prevé que las configuraciones sean comunes. El denominado sistema S&S se aplica solo a las configuraciones de un color. Se puede utilizar para las configuraciones de dos o tres pinturas, pero en ese caso los cromosomas pintados se tienen que examinar aisladamente, sin tener en cuenta los colores de las parejas [131]. Esta nomenclatura es de gran utilidad en los estudios mecánicos, en particular, por ejemplo, para comprender las reordenaciones complejas.

Recurriendo a una terminología más convencional, las traslocaciones se podrían denominar recíprocas, terminales o intersticiales [179]. Las dos primeras también se han denominado completas o bidireccionales e incompletas o unidireccionales, respectivamente. La tercera incluye las inversiones y las inserciones. Los términos completas/incompletas o recíprocas/terminales aluden a conceptos mecanicistas. A efectos de la dosimetría biológica probablemente sea mejor denominarlas mono o bidireccionales, meramente sobre la base de su aspecto visual y sin implicaciones mecanísticas. En efecto, los estudios mecanísticos han mostrado que las configuraciones unidireccionales no proporcionan una estimación fiable de la medida en que los intercambios son incompletos [180]. Las inserciones son uno de los muchos tipos de reordenaciones complejas que, según su definición formal, se forman como consecuencia de la presencia de tres o más roturas en dos o más cromosomas [177].

Las nomenclaturas descritas *supra* no son mutuamente excluyentes sino que se complementan, habiéndose realizado comparaciones de su aplicación a un mismo conjunto de datos [175].

En la actualidad, el método más difundido de registro de datos consiste en describir cada metafase anormal como una unidad propia utilizando la nomenclatura PAINT [175], pero de un modo ligeramente modificado [178] en que se consideran los mecanismos subyacentes a la formación de aberraciones. Se utilizan las abreviaciones del sistema PAINT, pero anotando las asociaciones entre los objetos de la metafase, con lo que se incorporan también aspectos de la terminología convencional. Las aberraciones cromosómicas se clasifican como simples o complejas, siendo estas últimas aquellas en que son necesarias tres o más roturas en dos o más cromosomas para producir la anormalidad observada. Las aberraciones se consideran completas cuando todas las piezas rotas se han reunido, e incompletas cuando una o más piezas no se han reunido.

Por ejemplo, t(Ba) observada con t(Ab) se considera una traslocación simple completa o una traslocación bidireccional, y cada una de las configuraciones, por sí sola, se considera una traslocación simple incompleta o unidireccional si aparece a solas en la metafase, a veces asociada a un acéntrico pintado, t(Ba) más ace(b). Las complejas se registran como tales y se describen como inserciones, por ejemplo ins(Aba), o como reordenaciones más complejas tales como una t(Ba) con ace(ab) o dic(BA) con t(Ab).

Adviértase que si se pinta un número limitado de cromosomas, las aberraciones tales como t(Ba) más t(Ab) se considerarán “aparentemente” simples. Se utiliza la designación “aparentemente” porque parecen simples pero podrían proceder de aberraciones complejas, si bien ello solo se podrá determinar si el complemento cromosómico completo se pinta con mFISH [181, 182].

10.4. MANEJO DE LOS DATOS

Lucas *et al.* [170] dedujeron las ecuaciones para calcular la equivalencia genómica, que fueron resumidas luego por Lucas y Deng [183].

La frecuencia de traslocaciones genómicas se suele calcular utilizando la fórmula de las fracciones genómicas pintadas [32], del modo siguiente:

$$F_G = \frac{F_p}{2,05 f_p (1 - f_p)} \quad (31)$$

donde:

F_G es la frecuencia de aberraciones del genoma entero,

F_p es la frecuencia de traslocaciones detectada con FISH, y

f_p es la fracción del genoma que se ha hibridado [170], teniendo en cuenta el sexo de la persona.

En la sección 10.4.1 se examina la cuestión más pormenorizadamente.

Se recomienda convertir los datos a equivalentes del genoma entero cuando los datos se tienen que combinar o cuando se comparan entre laboratorios los resultados de diversos estudios en los que se han utilizado distintas combinaciones de sondas de pintura de cromosomas enteros. La presunción, denominada en ocasiones fórmula de Lucas, es que la probabilidad de que un cromosoma pintado concreto haya participado en una aberración es proporcional a su contenido de ADN. La cuestión ha sido objeto de intensas investigaciones [184–186] y básicamente se acepta que esa presunción proporciona una aproximación razonable. Sin embargo, se ha llegado al consenso de que cuando en la fórmula de Lucas se utiliza el (contenido de ADN), la participación de los cromosomas mayores en las aberraciones de intercambio simple se sobrestima respecto de la de los de tamaño menor [187, 188]. Por consiguiente, el uso de (contenido de ADN)^{2/3} en la fórmula de Lucas en lugar de (contenido de ADN) da unos resultados más exactos. Algunos autores sostienen que ese tipo de proporcionalidad podría ser un indicio de que se producen intercambios en los que participa principalmente cromatina próxima a los límites de los territorios de los cromosomas [186–188]. Morton [32] da los mejores datos sobre el contenido relativo de ADN, y los valores que se muestran en los cuadros 2 y 3 se han calculado a partir de los datos de la columna 2 de su cuadro 4.

10.4.1. Pintado monocromático

Una fracción, f , del genoma se pinta (verde) y el resto, $1 - f$, se contrañe (azul).

Nota: por mor de simplicidad, f_p de la ecuación (31) se ha abreviado aquí a f .

Habrá	f^2	intercambios verde-verde
	$(1 - f)^2$	intercambios azul-azul
	$\frac{2f(1 - f)}{}$	intercambios azul-verde
	Total	1,00

Sin embargo, en ese total se incluyen los intercambios dentro de un mismo cromosoma, es decir, las inversiones. El número total de intercambios intercromosómicos es de 0,974, utilizando la mencionada presunción de proporcionalidad del ADN (véanse los cálculos en Lucas *et al.* [170]). Por consiguiente, la fracción de todas las traslocaciones que son traslocaciones azul-verde viene dada por la ecuación (32):

$$\frac{F_P}{F_G} = \frac{2f(1 - f)}{0,974} = 2,05f(1 - f) \quad (32)$$

donde:

F_P y F_G son, respectivamente, la frecuencia de traslocaciones medida con FISH y la frecuencia de traslocaciones del genoma entero.

La misma fórmula se aplicaría a los dicéntricos azul-verde.

Ejemplo

Supóngase que se han pintado las parejas de cromosomas 1, 2 y 4. Sus respectivos contenidos de ADN (para un varón), según el cuadro 2, son 0,0828, 0,0804 y 0,0639.

Por consiguiente, $f = 0,2271$, por lo que $F_P/F_G = 0,360$.

Esta combinación de pintura de cromosomas mide las traslocaciones bicolors con una eficiencia del 36 %. Por lo tanto, para obtener la producción de traslocaciones del conjunto del genoma, hay que dividir por 0,36 la producción observada.

10.4.2. Pintado bicromático

Supóngase que se pinta de rojo una fracción, f_1 , de verde otra fracción, f_2 , y que $(1 - f_1 - f_2) = f_3$ se contratiñe de azul.

Habrà:	f_1^2	intercambios rojo-rojo
	f_2^2	intercambios verde-verde
	f_3^2	intercambios azul-azul
	$2f_1f_2$	intercambios rojo-verde
	$2f_1f_3$	intercambios rojo-azul
	$2f_2f_3$	intercambios verde-azul

De nuevo, el total de intercambios intercromosómicos será de 0,974, y, por consiguiente, la fracción de todas las traslocaciones bicolores viene dada por

$$\frac{2(f_1f_2 + f_1f_3 + f_2f_3)}{0,974} - 2,05[f_1(1 - f_1) + f_2(1 - f_2) + f_3(1 - f_3)] \quad (33)$$

Ejemplo

Supóngase que las parejas de cromosomas 1, 2 y 4 se pintan de rojo; las parejas 3, 5 y 6 se pintan de verde y el resto se contratiñe de azul. Las fracciones obtenidas del cuadro 2 son $f_1 = 0,227$ y $f_2 = 0,186$:

$$\frac{F_P}{F_G} = 2,05(0,175 + 0,151 - 0,042) = 2,05(0,284) = 0,582 \quad (34)$$

Esta combinación detecta las traslocaciones con una eficiencia del 58 %. Cabe señalar que donde se produce un intercambio bidireccional entre dos cromosomas pintados de distinto color, el evento se contabiliza como uno solo.

10.4.3. Más de dos colores

Los cálculos se pueden ampliar al pintado FISH multicolor. Cuando se utilizan muchos colores, la ecuación se convierte en

$$\frac{F_P}{F_G} = 2,05 \left[\sum_i f_i(1 - f_i) - \sum_{i < j} f_i f_j \right] \quad (35)$$

Todos los cálculos que se detallan en esta sección están disponibles en el programa informático Dose Estimate mencionado en la sección 8.3.

10.5 NIVEL DE CONTROL DE LAS TRASLOCACIONES

Los niveles de control de las traslocaciones son superiores a los de los dicéntricos, lo que en cierta medida se debe a que se trata de aberraciones persistentes. Por consiguiente, es importante que cuando se realiza una dosimetría retrospectiva se tenga en cuenta el fondo de traslocaciones, en particular en el caso de las dosis bajas.

Obviamente, no se dispone de muestras de sangre de control previas a la exposición de la persona irradiada accidentalmente o del grupo de población estudiado, por lo que se deberá utilizar un valor supuesto basado en datos de reconocimiento genéricos. Lo ideal es que los laboratorios desarrollen una base de datos de control propia, pero se trata de un empeño de envergadura, dado que debería abarcar cierto número de factores de confusión y, especialmente, un amplio intervalo de grupos de edad. En un metaanálisis integral publicado

por Sigurdson *et al.* [107] se encuentra actualmente la mejor base de datos internacional, desglosada por edad, sexo, raza y hábito de fumar. Contiene datos procedentes de un estudio anterior en el que se combinaban los resultados de algunos laboratorios europeos [189].

A partir de esos dos estudios se observa claramente que la edad es el principal factor que determina la frecuencia de fondo de traslocaciones, que aumenta sustancialmente por encima de los 60 años de edad (figura 31).

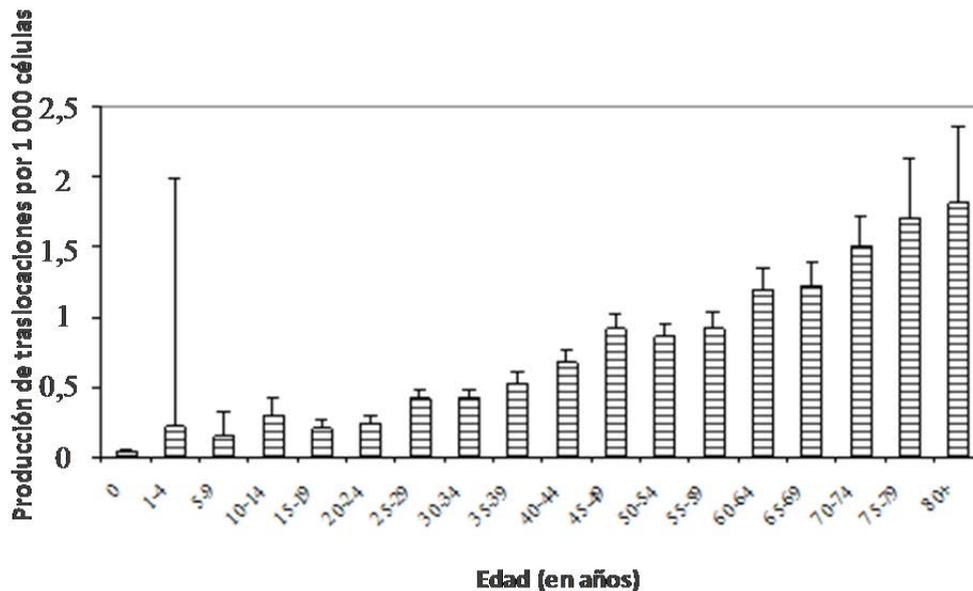


Fig. 31. Número de traslocaciones en función de la edad [107].

Es importante tener en cuenta el fondo y restar del número de traslocaciones observadas en los linfocitos de una persona la tasa de traslocaciones prevista en función de su edad. Además de un efecto confirmado en laboratorio, el estudio de Sigurdson *et al.* [107] mostró una importante variación entre las cuatro principales zonas geográficas. Por el contrario, no se observó efecto en lo que se refiere a la etnicidad o el sexo. Por consiguiente, parece esencial que únicamente se comparen los datos del propio laboratorio al estudiar los factores que influyen en la tasa de traslocaciones.

Entre los escasos estudios que notifican un efecto del sexo en la tasa de traslocación [107, 189, 190], únicamente el de Whitehouse *et al.* [189] muestra una tasa de traslocación más alta entre los hombres que entre las mujeres para el grupo de edad de 20–29 años, significativamente diferente del grupo de edad de 30–39 años ($p < 0,05$). Para los demás grupos de edad, las mujeres presentaban una tasa más alta que los hombres, aunque la diferencia no era significativa. En los otros estudios donde se examinó el efecto del sexo no se encontraron pruebas de diferencia alguna [107, 190, 191], ni siguiera desglosando por grupos de edad.

Si bien los estudios coincidieron unánimemente en que la tasa de traslocaciones aumenta con la edad, el resultado de esa revisión de la bibliografía muestra que esa tendencia no es tan clara para algunos otros factores (cuadro 12).

CUADRO 12. RESUMEN DE LOS EFECTOS DE LOS FACTORES ESTUDIADOS EN LA PRODUCCIÓN DE TRASLOCACIONES Y DICÉNTRICOS

Factor de confusión	Estudios importantes y referencias conexas	Referencias adicionales
Alcohol	Badr y Hussain [192] Burim <i>et al.</i> [193]	
Tabaco	Ramsey <i>et al.</i> [191]	Tawn y Cartmel [195]
	Bothwell <i>et al.</i> [194]	Van Diemen <i>et al.</i> [196]
	Sigurdson <i>et al.</i> [107]	Pressl <i>et al.</i> [190]
		Tucker <i>et al.</i> [197]
		Whitehouse <i>et al.</i> [189]
		Maeng <i>et al.</i> [198]
		Beskid <i>et al.</i> [199]
		Pluth <i>et al.</i> [200]
Plaguicidas	Steenland <i>et al.</i> (aplicadores) [201]	Tucker [197]
Benceno	Smith <i>et al.</i> (>31 ppm) [203]	Kim <i>et al.</i> [202]
		Smith <i>et al.</i> (< 31 ppm) [203]
		Zhang <i>et al.</i> [204]
Contaminación industrial	Beskid <i>et al.</i> [199]	Beskid <i>et al.</i> [205]
	Sram <i>et al.</i> [206]	
Metales pesados	Maeng <i>et al.</i> (cromo, solo fumadores) [198]	Dulout <i>et al.</i> (arsénico) [208]
	Doherty <i>et al.</i> (cromo) [207]	Maeng <i>et al.</i> (cromo, solo no fumadores) [198]

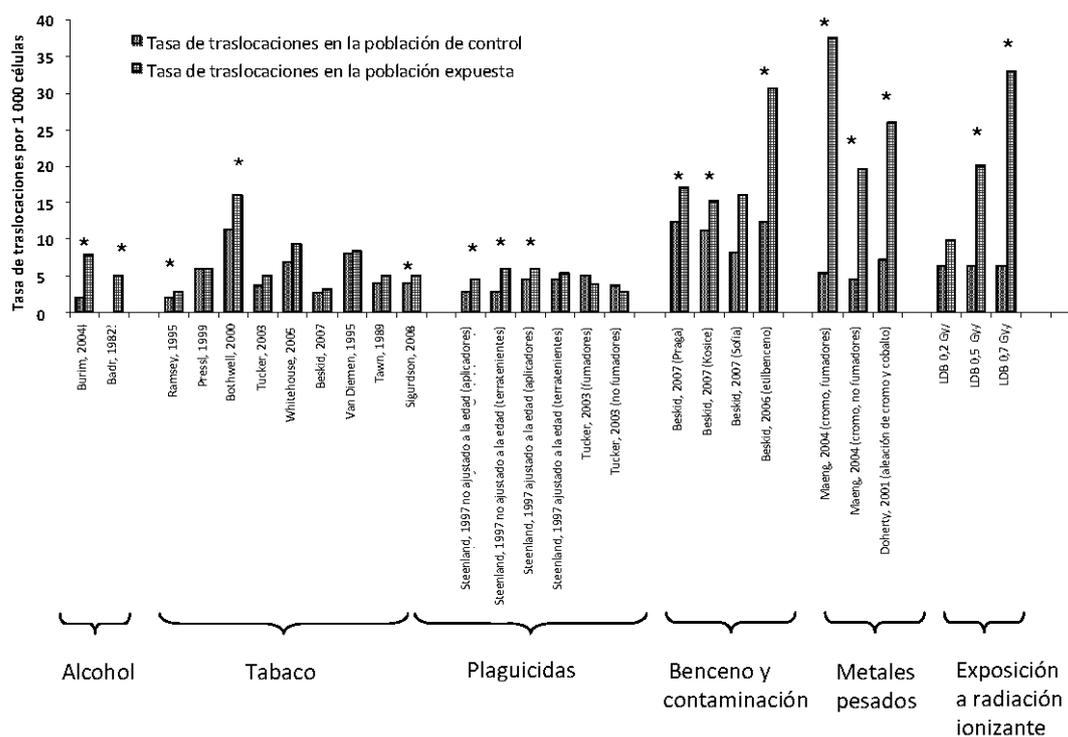
Únicamente el alcohol mostró una tendencia a crear un exceso de traslocaciones en los dos estudios en que fue considerado. Esa tendencia no se observó para el tabaquismo (8/11 estudios) ni los plaguicidas (1/2 estudios). El benceno es un caso particular, puesto que los análisis se realizaron para los cromosomas que intervienen en enfermedades relacionadas específicamente con la exposición. Ello significa que en algunos estudios [202–204] solo se registraron los intercambios entre dos cromosomas (Nº 8 y Nº 21 o Nº 14 y Nº 18). En los tres se registró un efecto significativo cuando se estudiaban únicamente las tasas de traslocación t (8;21) y t (14;18). Sin embargo, se identificaron tres estudios en los que se examinaban las traslocaciones entre esos cromosomas y todos los demás, sin que ninguno mostrara resultados significativos.

Las sustancias que se consumen y de las que se abusa por elección tales como el tabaco, las drogas y el alcohol, solo afectan a las traslocaciones cuando el consumo es importante y crónico. De todos modos, a menudo inducen un aumento importante de las tasas de traslocación cuando se combinan o asocian con otros tipos de agentes (metales y sustancias químicas mutágenas) [192]. Los efectos sinérgicos de las sustancias objeto de abuso

notificados en algunos estudios sugieren que el tabaquismo aumenta la tasa de traslocaciones debidas a una exposición ocupacional. Ese es el caso de las personas expuestas a radiaciones ionizantes [194], plaguicidas [197] y al cromo [198]. El efecto sinérgico del tabaquismo es aún más evidente en cuanto que la mayoría de los estudios de los efectos del tabaquismo por sí solo no muestran ningún aumento significativo de la tasa de traslocaciones. Por el contrario, para el alcoholismo es más difícil demostrar el efecto sinérgico porque los alcohólicos rara vez presentan una única adicción, o al menos porque la cifra de los que no tienen otras adicciones es demasiado baja para realizar un análisis comparativo con un grupo de control. Por lo tanto, sería instructivo un estudio del impacto en la tasa de traslocaciones causadas exclusivamente por el alcoholismo.

A menudo, el efecto de los agentes tóxicos del lugar de trabajo (plaguicidas, benceno y metales) en la cifra de traslocaciones es proporcional a la dosis y la duración de la exposición. Asimismo, se ha demostrado que la exposición a una mezcla de productos es más dañina que la exposición a un solo elemento químico. Por último, la eficacia de la protección personal (guantes, máscaras, mono de trabajo/overol) ha sido demostrada por la disminución de la tasa de traslocaciones entre la población expuesta a esos tipos de sustancias mutágenas.

En la figura 32 se ilustra el impacto de los factores estudiados en la tasa de traslocaciones en función del tipo de factor, la exposición, y de los estudios.



LDB: Tasa de traslocaciones obtenida en el Laboratoire de Dosimétrie Biologique para una dosis de radiación dada (exposición a cobalto, tasa de dosis de 0/5 Gy/min)

* Estudios en los que la diferencia entre el grupo expuesto y el grupo de control es significativa

Fig. 32. Comparación entre las tasas de traslocaciones debidas a diferentes agentes y la tasa de traslocaciones provocada por la irradiación *in vitro*.

Para cada estudio se indica la tasa de traslocaciones por 1 000 células en la población de control y en la población expuesta. Además, para comparar las tasas de inducción, en la figura se presenta asimismo la tasa de traslocaciones obtenida irradiando *in vitro* muestras de sangre con dosis de 0,2, 0,5, and 0,7 Gy. Sin embargo, es necesario señalar que las irradiaciones se

llevaron a cabo en un breve intervalo de tiempo, y que se trataba de exposiciones agudas, mientras que las exposiciones al alcohol, el tabaco fumado, los plaguicidas o al benceno son crónicas. Las exposiciones se designan como crónicas cuando la persona ha sido expuesta al agente genotóxico durante toda su vida o una parte importante de ella (modo de vida o exposición ocupacional).

En la figura 32 se muestra asimismo que la tasa de traslocaciones halladas en las poblaciones expuestas al alcohol, el tabaco fumado y los plaguicidas es considerablemente inferior a las tasas medidas para la exposición al benceno y, especialmente, al cromo. Además, los valores correspondientes a los grupos de control son relativamente similares a los observados en los grupos expuestos al alcohol, el tabaco fumado y los plaguicidas. En comparación con un grupo expuesto a radiaciones ionizantes a una dosis de 0,5 Gy, la tasa de traslocaciones para las personas expuestas al alcohol, el tabaco fumado y los plaguicidas es baja. Por consiguiente, se puede extraer la conclusión de que cuando se observa una tasa de traslocaciones elevada, esta se puede atribuir a una irradiación. Por el contrario, durante un estudio retrospectivo de la exposición a radiaciones ionizantes entre personas muy expuestas al cromo o al benceno no será posible distinguir las tasas de traslocaciones de origen radiológico de las de origen ambiental. De todos modos, la exposición al benceno o al cromo no es común, por lo que debería ser posible identificarla mediante un cuestionario apropiado que abarque las actividades ocupacionales pasadas y presentes.

10.6. PERSISTENCIA DE LAS TRASLOCACIONES

El mayor inconveniente del método de los dicéntricos es que la cantidad de aberraciones presentes en las personas expuestas disminuye a medida que aumenta el tiempo transcurrido desde la exposición. Los dicéntricos inducidos en el conjunto de linfocitos periféricos circulantes se van perdiendo debido a la muerte de las células y se van diluyendo por la renovación de las células sanguíneas. Se trata de aberraciones mitóticamente inestables, incapaces de atravesar repetidamente la división celular. Por el contrario, en general las traslocaciones son mitóticamente estables y, siempre que la célula en su conjunto sea estable (C_S), las traslocaciones inducidas en las células madre pueden persistir y transmitirse hasta los linfocitos circulantes. Inicialmente, las traslocaciones se inducen con una frecuencia similar a la de los dicéntricos, pero su estabilidad posterior a la irradiación es la que las hace más adecuada a efectos de dosimetría biológica retrospectiva.

La persistencia de la frecuencia de traslocación es objeto de debate desde hace tiempo. Varios años después del accidente de Goiânia (Brasil), se constató que la frecuencia de traslocaciones era inferior a la frecuencia de dicéntricos observada inmediatamente después de la exposición [209, 210]. Sin embargo, en ninguno de esos estudios se conocía la producción inicial de traslocaciones. En un estudio retrospectivo del personal nuclear industrial de Mayak, en el sur de los Urales, las dosis estimadas fueron en general inferiores a lo que se habría predicho a partir de la curva de calibración de las traslocaciones transmisibles aparentemente simples [211]. Otros estudios de seguimiento de personas irradiadas accidentalmente mostraron que la frecuencia de las traslocaciones se mantenía relativamente constante a lo largo del tiempo. En las personas irradiadas en Chernóbil no se observó un cambio sustancial de las frecuencias de traslocación entre 5 y 8 años después del accidente [212]. En personas cuyos cuerpos habían resultado irradiados enteramente en un accidente en Estonia, las frecuencias de traslocaciones se mantuvieron bastante constantes durante dos años, salvo en el caso de una persona que había sufrido una irradiación prolongada y no uniforme de todo el cuerpo [213]. Sin embargo, cuatro años después de ese mismo accidente, la frecuencia de todas las traslocaciones en células que contenían únicamente reordenaciones sencillas descendió en promedio al 65 % de su valor inicial, aunque la persistencia de las traslocaciones bidireccionales era ligeramente superior a la del total de las traslocaciones

[214]. La disminución de la frecuencia de las traslocaciones a lo largo del tiempo se atribuyó a que la irradiación del cuerpo había sido parcial, lo que es congruente con la idea de que en esas exposiciones las distribuciones de dicéntricos y de traslocaciones coinciden [215, 216]. De ello se seguiría que en exposiciones parciales del cuerpo la estimación de la dosis del cuerpo entero en intervalos de tiempo largos después de la exposición tenderá a ser más baja a medida que aumenta la dosis [215].

En otros casos de exposiciones accidentales de personas se ha descrito una disminución más marcada de la frecuencia de traslocaciones con el paso del tiempo a medida que aumenta la dosis; la frecuencia de traslocaciones persistía con el tiempo para dosis inferiores a 1–3 Gy, pero se observaba un descenso para dosis más altas [217, 218]. En pacientes de cáncer tratados con radioterapia se observó una clara disminución de la producción de traslocaciones a lo largo del tiempo transcurrido desde la irradiación, que era más pronunciada en las personas con una elevada frecuencia inicial de traslocaciones [219–222]. Una posible explicación de esas observaciones en el caso de los pacientes de radioterapia es la dosis letal impartida a las células madre y la repoblación de esa zona por células no irradiadas procedentes del exterior de la parte irradiada del cuerpo. En conjunto, esos resultados señalan que, a dosis altas, la producción inicial de traslocaciones quizá no sea siempre constante a lo largo del tiempo transcurrido a partir de la irradiación.

Que las traslocaciones sean o no completas o complejas puede influir en su desaparición a lo largo del tiempo transcurrido después de la irradiación. La mayoría de las aberraciones complejas no son transmisibles, por lo que las células que las porten irán desapareciendo a medida que va transcurriendo el tiempo a partir de la irradiación [213, 215, 223–226].

Otro factor que contribuye a la persistencia de las traslocaciones es la coincidencia de traslocaciones y aberraciones inestables en una misma célula. De ahí que se haya propuesto, y se esté estudiando, la posibilidad de considerar las células estables, en lugar del total de células, en las estimaciones retrospectivas de la dosis. En un estudio de seguimiento de las víctimas del accidente de Estonia, la producción inicial de traslocaciones, considerando la totalidad de las células, disminuyó alrededor del 70 % al cabo de 2 años [214]. Sin embargo, un nuevo estudio del mismo grupo, en el que se volvieron a analizar las imágenes digitalizadas de las células dañadas para seleccionar las que no presentaban aberraciones inestables, indicó que al cabo de 7 años la producción de traslocaciones era similar a la de los dos primeros años. De todos modos, el estudio presentaba limitaciones, puesto que se basaba en imágenes de células que se habían elegido porque en ellas los cromosomas pintados presentaban lesiones. No era posible introducir correcciones para tener en cuenta las células consideradas “normales” en lo que se refiere al material pintado, porque no se habían digitalizado. No obstante, el estudio, considerado admitiendo la posibilidad teórica de que al cabo de un largo intervalo de tiempo solo habrán persistido las células estables, sugiere que es más apropiado considerar la producción de traslocaciones en las células estables que la producción en la totalidad de las células. La cuestión solo se resolverá en última instancia mediante buenos estudios de seguimiento con FISH y análisis de las aberraciones inestables, realizados en paralelo en víctimas de irradiaciones accidentales e iniciados con prontitud después de la exposición.

10.7 CURVAS DE CALIBRACIÓN

Para las estimaciones de la dosis con traslocaciones detectadas con FISH, cada laboratorio deberá establecer curvas propias. Los cálculos matemáticos del ajuste de la curva son los mismos que se aplican para los dicéntricos, que se han descrito en la sección 8.3. La curva se deberá preparar con la misma combinación de sondas FISH que se utilice ordinariamente en las investigaciones de casos. De ese modo se elude la necesidad de realizar una conversión a equivalentes de genoma, lo que podría introducir una incertidumbre adicional.

En el caso de las radiaciones de baja TLE, una vez construidas las curvas de calibración para las traslocaciones teniendo en cuenta las células estables o todas las células, no había diferencias en los coeficientes de ajuste y solo se consideraron las traslocaciones aparentemente simples [227, 228]. Sin embargo, se recomienda que durante el análisis al microscopio se recuenten todas las aberraciones detectadas en el conjunto entero de cromosomas, no solo las que afectan al material pintado [64]. De ese modo se podrá determinar con certitud si la limitación a las células estables produce estimaciones de la dosis más realistas.

En general, se realizarán estimaciones de la dosis con FISH cuando las dosis hayan sido altas pero prolongadas, o tras una exposición a radiaciones bajas mucho tiempo atrás, que no manifiesten signos médicos. Al contrario que la dosimetría de exposiciones agudas, en las que se utilizará una curva lineal cuadrática, aquí el término lineal α de la curva de dosis-respuesta tiene una importancia decisiva. Se puede utilizar la prueba de la F mencionada en la sección 8.3 para verificar la fiabilidad del coeficiente lineal. Pocas, o ninguna, de las curvas de calibración publicadas tienen suficientes recuentos en el rango de las dosis bajas para haber obtenido un coeficiente lineal suficientemente fiable con un intervalo de confianza pequeño [64]. Para construir una relación de dosis lineal, hay que examinar un gran número de células en varios puntos de dosis por debajo de 1 Gy, lo que entraña un trabajo considerable. Entre tanto se pueden formular un cierto número presunciones para resolver ese problema. La razón de formación de dicéntricos y traslocaciones es de alrededor de 1:1 [229, 230], por lo que se pueden prever unos coeficientes de dosis-respuesta similares. Los datos publicados sobre diversos estudios de dicéntricos sugieren un coeficiente de calibración lineal de alrededor de 15–20 traslocaciones por 1 000 células de equivalente de genoma por Gy para rayos gamma de alta energía [51]. Se sabe también que el término lineal de las curvas de dosis-efecto está influido mayoritariamente por la calidad de la radiación, definida por su transferencia lineal de energía, mientras que la curvatura se debe al coeficiente β , que está modificado por la tasa de dosis (según se describe en la corrección del término G en la sección 9.7.4.5). Hay indicaciones de que el coeficiente lineal obtenido con una exposición crónica *in vitro*, siempre que se lleve a cabo a la temperatura del cuerpo, no difiere del notificado para el término lineal de la respuesta a una dosis aguda [233]. Por consiguiente, hasta que se hayan obtenido coeficientes lineales fiables para traslocaciones FISH mediante experimentos de calibración de respuestas a dosis bajas *in vitro*, es razonable utilizar el término lineal obtenido con radiaciones de la misma calidad en curvas agudas de calibración de dicéntricos.

En la reconstrucción de la dosis mucho tiempo después de la exposición, la estimación de la dosis se basará en la presunción de que los linfocitos irradiados *in vitro* y las células madre sanguíneas irradiadas *in vivo* mostrarán frecuencias de traslocaciones similares. No se sabe con certeza si las células madre y los linfocitos maduros tienen idéntica radiosensibilidad, ni si influyen las divisiones celulares intermedias, en las que se eliminan células que portan aberraciones inestables. En dosimetría retrospectiva se supone que no se trata de factores de confusión importante, y en la bibliografía reciente se sugiere que no tiene importancia práctica alguna [64].

En conclusión, la reconstrucción de la dosis sobre la base de las traslocaciones presentes en células estables es un método bien establecido [174], pero presenta limitaciones. Parece ser un buen instrumento en caso de exposiciones a dosis prolongadas y bajas, cuando predomina el término lineal de la curva de calibración. Como medida transitoria se puede utilizar a modo de presunción el término obtenido para las curvas de dosis-respuesta de dicéntricos. Después de una exposición a dosis altas, especialmente agudas, limitarse a las células estables puede propiciar la subestimación de la dosis, puesto que el número de células que posean traslocaciones en células inestables aumentará junto con el número de las aberraciones complejas. Además, la dosis superior para la que se puede calibrar tiene un límite, puesto que cada vez escasean más las células que no contienen lesiones inestables.

10.8. EJEMPLOS DE FISH UTILIZADOS EN DOSIMETRÍA BIOLÓGICA RETROSPECTIVA

Estos estudios se diseñaron para investigar la viabilidad de la prueba de traslocaciones FISH en dosimetría retrospectiva para 1) poblaciones sin investigaciones de dosimetría biológica o física previas; 2) poblaciones con estimaciones de dosimetría física conocidas; y 3) poblaciones con estimaciones de dosimetría biológica conocidas obtenidas por análisis de dicéntricos convencional inmediatamente después de la exposición. Los datos del último grupo se consideran los más fiables para la comparación de las frecuencias de traslocaciones con el fin de definir la estabilidad de las traslocaciones.

Se seleccionaron cuatro grupos de estudio, integrados por 1) trabajadores de la central nuclear; 2) poblaciones que vivían en zonas contaminadas; 3) trabajadores que participaron en la limpieza de Chernóbil; y 4) personas o grupos expuestos accidentalmente.

10.8.1. Dosimetría biológica retrospectiva en grupos de población sin dosimetría personal previa

Con objeto de obtener estimaciones retrospectivas de las dosis de radiación se determinó la frecuencia de aberraciones cromosómicas en 15 personas de las que constaba que habían estado fuertemente expuestas como consecuencia del accidente de Chernóbil, todas las cuales habían recibido tratamiento para los síntomas de la fase tardía del síndrome cutáneo causado por la radiación.

Los estudios empezaron en 1991 y se realizaron seguimientos hasta 1994 [212, 233, 234]. En 1991 se determinaron las estimaciones de los equivalentes de dosis biológicas, ya sea midiendo la frecuencia de dicéntricos y cromosomas en anillo mediante el método Qdr, ya midiendo la frecuencia de traslocaciones estables utilizando FISH con genotecas de ADN específico para cromosomas enteros y una sonda pancentromérica de ADN. Con los dos métodos se obtuvieron estimaciones bastante comparables de dosis individuales de entre 1,1 y 5,8 Gy para 12 de las 15 personas, mientras que tres de ellas no mostraron frecuencias elevadas de aberraciones [234]. Para los estudios de seguimiento se examinaron las frecuencias de traslocaciones en los mismos donantes durante tres años, desde septiembre de 1991 hasta julio de 1994, manteniéndose bastante constantes en 11 de los 12 casos. De ese modo se pudieron obtener estimaciones comparables de la dosis a partir de los diversos intervalos de muestreo [212].

De esos estudios no se puede extraer una conclusión directa acerca de la estabilidad de las traslocaciones, puesto que no se dispone de datos de referencia inmediatamente posteriores a la exposición (es decir, dosimetrías biológicas y físicas). Sin embargo, los estudios de seguimiento indican que las traslocaciones pueden permanecer constantes cuando han transcurrido cinco años desde el momento de la exposición, y para diferentes niveles de dosis.

10.8.2. Dosimetría biológica retrospectiva en grupos de exposición poblacional u ocupacional con estimaciones de la dosis física

En varios estudios diseñados principalmente para estimar las dosis absorbidas se han examinado las frecuencias de aberraciones cromosómicas en los linfocitos, por ejemplo, en las víctimas de las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki (Japón) o en los trabajadores que han realizado tareas de limpieza en Chernóbil. Las frecuencias de traslocaciones registradas en los supervivientes de bombas atómicas parecían próximas a los valores previstos obtenidos para cada persona a partir las dosis estimadas con el DS86 (sistema de dosimetría de 1986), en comparación con una curva de dosis-respuesta *in vitro* [145]. Por consiguiente, los estudios respaldaban la noción de que las traslocaciones persisten a largo plazo. Sin embargo, se constató una importante diferencia en el caso de cuatro trabajadores irradiados durante el accidente ocurrido en 1959 en la planta Y-12 de Oak Ridge (EE.UU.), donde varios años más tarde las frecuencias de traslocaciones eran sustancialmente inferiores a los valores previstos [170].

En 1994 se llevó a cabo un estudio piloto en alrededor de 60 personas de Estonia contratadas para tareas de limpieza en Chernóbil en 1986 o 1987 con dosis registradas que iban de 0 a 300 mSv, con el fin de determinar si los análisis de los dicéntricos y las traslocaciones se correspondían con las dosis que se habían registrado [235]. En otro conjunto de investigaciones se estudiaron con pintado FISH 52 encargados de tareas de limpieza [236]. Las estimaciones de dicéntricos ya no eran válidas, pero se podían utilizar las traslocaciones para verificar las dosimetrías tempranas realizadas únicamente para las personas que habían recibido las irradiaciones más altas. Para la gran mayoría de las personas menos expuestas se constató que FISH no era práctico a modo de dosímetro individual. Sin embargo, se ha sugerido que tiene cierto valor para diferenciar los grupos de personas expuestas a distintas dosis [235], lo que está respaldado por el estudio de los limpiadores estonios [92, 237].

Existe otro conjunto de datos sobre 75 trabajadores de Mayak para los que se disponía de dosimetría física y cuya exposición principal se había producido entre 1948 y 1963 [238]. Se notificaron dosis externas acumulativas de entre 0,02 y 9,91 Sv y cargas de plutonio de entre 0,26 y 18,5 kBq. A los 35 a 40 años de exposición prolongada se determinaron las frecuencias de traslocaciones utilizando sondas de pintado de cromosomas enteros para los cromosomas N^{os} 1, 4 y 12 en combinación con una sonda pacentromérica. Los resultados mostraron una frecuencia de traslocaciones más alta en los trabajadores de Mayak respecto de un grupo de control emparejado. Sin embargo, en general el rango de producciones de traslocaciones era inferior al previsto a partir de las dosis personales registradas y las curvas de calibración [235, 238].

Se realizó un pintado FISH en preparaciones de metafases obtenidas de 73 residentes de asentamientos situados a lo largo del río Techa, expuestos a radiaciones. El grupo de estudio comprendía dos subgrupos que vivían en asentamientos situados ya sea entre 7 y 60 km o entre 78 y 148 aguas abajo de las instalaciones. Ambos se distinguieron de los controles y se observaron frecuencias medias de traslocaciones significativamente más altas [239].

En el periodo de 1991 a 1994 se realizaron estudios de dosimetría biológica de trabajadores expuestos a la radiación en el emplazamiento nuclear de Sellafield que habían acumulado dosis de por vida impartidas al cuerpo entero de entre 173 y 1 108 mSv, y que en todos los casos salvo tres eran >500 mSv. Al dividir a los trabajadores en cohortes por rangos de dosis, las frecuencias medias de traslocaciones de los grupos mostraron un aumento significativo con las categorías de dosis. Por el contrario, las dosis de por vida acumulativas no guardaban relación con las frecuencias de dicéntricos [240].

En supervivientes de la bomba atómica de Hiroshima se constató una buena correlación entre la dosimetría por resonancia de espín electrónico y la dosimetría citogenética mediante frecuencias de traslocaciones en linfocitos procedentes de 40 supervivientes que vivían cerca (aproximadamente a 2 km) del hipocentro y que tenían al menos 10 años de edad en el momento del bombardeo [241]. Los estudios de supervivientes de la bomba atómica de Hiroshima señalan la persistencia de las traslocaciones estables. Sin embargo, de otros estudios mencionados *supra* se desprende que una fracción de las traslocaciones parece disminuir en función del tiempo transcurrido desde la exposición.

10.8.3. Dosimetría biológica retrospectiva en personas con estimaciones de dosis biológicas conocidas realizadas poco después de los accidentes utilizando análisis de dicéntricos convencionales

Accidente con tritio

La sobreexposición accidental a agua tritiada descrito *supra* (sección 9.7.5.7) se examinó también retrospectivamente con FISH [242]. Inicialmente, los dicéntricos indicaron una dosis promedio de 0,38 Gy, que se correspondía bien con los 0,47 Gy obtenidos midiendo el tritio presente en la orina. Esos valores son dosis promedio impartidas a tejidos blandos del cuerpo

cuando el tritio se incorpora al agua del cuerpo y provoca una exposición más o menos uniforme de todos los tejidos blandos. Las muestras de sangre obtenidas subsiguientemente mostraron una disminución prevista de la producción de dicéntricos congruente con una semitiempo de desaparición de 3,3 años.

Seis y once años después del accidente se hicieron sendos intentos de dosimetría FISH utilizando las producciones combinadas de traslocaciones uni y bidireccionales. En la primera ocasión, un laboratorio realizó el análisis con pintura monocromática de los cromosomas N^{os} 1, 2 y 4, y para el segundo análisis los trabajos se compartieron con otro laboratorio, que pintó los cromosomas N^{os} 2, 3 y 5. Se realizaron estimaciones de las dosis refiriéndose a una calibración *in vitro* obtenida con tritio en uno de los laboratorios, que dio una curva de dosis-respuesta lineal para el total de traslocaciones corregido para el genoma completo de $Y = C + (5,26 \pm 0,49) \times 10^{-2}D$. Los datos combinados de la totalidad de los recuentos FISH dio una estimación de la dosis de 0,48 Gy.

Accidente de Goiânia

En el accidente de radiación de Goiânia (Brasil, 1987) quedó expuesto un gran número de personas cuando se rompió y se abrió una fuente agotada de radioterapia de ¹³⁷Cs [149, 150]. El grupo de personas formaba una buena cohorte para la realización de estudios de seguimiento. Inmediatamente después de la detección del accidente se analizaron las frecuencias de dicéntricos y anillos en 129 personas afectadas. En 29 personas, la dosis estimada se situaba en el intervalo de 0,3 a 5,9 Gy [243]. Si bien la mayoría de las personas sufrieron una exposición no homogénea, sugerida por la presencia de lesiones cutáneas localizadas, en todos los casos salvo seis las aberraciones mostraron una distribución de Poisson. En algunas de las víctimas el seguimiento se prolongó durante años, realizándose dosimetrías retrospectivas de la radiación examinando las frecuencias de dicéntricos (los análisis comenzaron de inmediato) y las traslocaciones, mediante FISH (se comenzó al cabo de cinco años) [209].

Los datos sobre frecuencias de traslocaciones obtenidos con FISH (mediante diversas combinaciones de sondas que abarcaban alrededor del 80 % del genoma) se podían comparar directamente con las frecuencias originales de referencia de dicéntricos de las mismas personas [209]. Las frecuencias de traslocaciones observadas años después de la exposición a la radiación (a partir de 1992) a dosis superiores (>1 Gy) eran entre dos y tres veces inferiores a los dicéntricos iniciales determinados en 1987. Para niveles de exposición considerados <0,9 Gy se encontraron pequeñas diferencias entre las frecuencias de traslocaciones y las producciones iniciales de dicéntricos. Se podría mejorar la exactitud de esas estimaciones de dosis examinando más células. Sin embargo, la precisión de esas estimaciones se ve reducida por factores tales como la persistencia de linfocitos que contienen traslocaciones, la falta de proporcionalidad entre los niveles de traslocaciones y el tamaño de los cromosomas y las variaciones individuales. No se constató ningún descenso de las traslocaciones uni o bidireccionales durante el seguimiento [209], lo que coincide con los estudios de Chernóbil. Straume *et al.* [244], utilizando FISH, evaluaron asimismo dos víctimas del accidente de Goiânia un año después de su exposición. Al comparar los datos con las frecuencias de dicéntricos obtenidas inmediatamente después del accidente se observó que la frecuencia de traslocaciones había disminuido.

Accidentes en Alemania y Estonia

Por el contrario, en otro estudio [245] realizado 11 años después de un accidente que afectó a tres trabajadores expuestos a la radiación, la prueba FISH, realizada con los cromosomas N^{os} 2, 4 y 8 y una sonda pancetromérica, dio unas frecuencias de traslocaciones estables que no diferían significativamente de las frecuencias medias de dicéntricos

determinadas con tinción FPG convencional poco después de la detección del accidente. Se determinó que alrededor del 75 % de las traslocaciones eran de tipo bidireccional. Después de un accidente radiológico ocurrido en Estonia en 1994 se realizaron análisis cromosómicos un mes, y subsiguientemente 2, 6, 10, 12, 17, 22 y 24 meses, después de la exposición de cinco personas que, según se calculó, habían recibido aproximadamente de 1 a 3 Gy [213, 246]. En los estudios de seguimiento las traslocaciones bidireccionales se mantuvieron relativamente estables en las cinco personas, y en una persona se observó una importante disminución de las traslocaciones unidireccionales. A los 12 meses de la exposición, los dicéntricos habían disminuido en todas las personas hasta alrededor del 50 % de las frecuencias iniciales [246]. Según otro estudio de seguimiento que abarcó los 7 años posteriores al accidente, el recuento de las traslocaciones de las células estables pareció anular la disminución de las traslocaciones observada en todas las células. En las células estables, durante los primeros años de seguimiento la producción de traslocaciones fue independiente del tiempo [174].

Accidente de Estambul

En la sección 9.7.5.6 se describe un caso en el que varias personas resultaron irradiadas por una fuente de ^{60}Co sin blindaje, mezclada con metal de chatarra. Transcurrió un mes desde el momento del accidente hasta que las autoridades reconocieron que se habían producido exposiciones a la radiación. Los pacientes presentaban recuentos sanguíneos considerablemente disminuidos. Para las cinco personas más fuertemente expuestas, los análisis de dicéntricos señalaban dosis de entre 2,2 y 3,1 Gy. En esos cálculos, para tener en cuenta la prolongación de las exposiciones durante varias horas se introdujo el ajuste de la función G a la curva de dosis-respuesta. En la sección 9.7.4.4 se señala que cuando las exposiciones son suficientemente importantes para causar efectos determinísticos tales como la disminución del recuento sanguíneo, la producción de dicéntricos puede reducirse apreciablemente a lo largo de un período de unas pocas semanas.

También se realizó dosimetría con FISH con las mismas muestras de sangre que se utilizaron en la prueba de dicéntricos. Los análisis se llevaron a cabo en tres laboratorios [158], y las estimaciones de dosis resultantes se basaron en las producciones de traslocaciones uni y bidireccionales combinadas de los laboratorios. Las estimaciones de dosis con FISH, en las que también se había introducido el ajuste de la función G, eran entre un 20 y un 30 % superiores a los valores obtenidos con los dicéntricos.

El uso de FISH a modo de dosímetro retrospectivo suele plantearse cuando la toma de muestras de sangre se produce años después de la irradiación, o cuando se han producido exposiciones prolongadas, por ejemplo, por causa de una contaminación ambiental por radionucleidos. Sin embargo, este caso es un buen ejemplo de que la prueba FISH también puede ser útil cuando se han recibido dosis altas y las muestras se han obtenido con un retraso moderado, o en una escala temporal en la que, para dosis menores, la prueba de dicéntricos suele considerarse bastante adecuada.

Accidente en Georgia

Once jóvenes guardias fronterizos resultaron expuestos accidentalmente a una o varias fuentes de ^{137}Cs con una actividad que no superaba los 150 GBq en el centro de entrenamiento militar de Lilo. Las fuentes estaban destinadas a fines de entrenamiento y para la calibración de instrumentos. Las víctimas estuvieron irradiadas durante aproximadamente un año, desde mediados de 1996 hasta abril de 1997 [247].

Cuatro de las personas más expuestas fueron hospitalizadas en Francia, donde en noviembre de 1997 se realizaron pruebas citogenéticas [248] (cuadro 13).

CUADRO 13. CIFRAS Y, ENTRE CORCHETES, FRECUENCIAS DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS INESTABLES POR CÉLULA^a

Paciente	Células examinadas	Dic	Rc	Ace	Prueba de la u	Dosis, dic	Dosis, FISH
						Gy [95 % CI]	Gy [95 % CI]
1	500	14 (0,03)	0 (0,000)	11 (0,022)	-0,43	0,4 [0,2-0,6]	0,7 [0,4-1,0]
2	500	19 (0,04)	1 (0,002)	15 (0,030)	-0,59	0,5 [0,4-0,7]	0,4 [0,1-0,7]
3	502	55 (0,11)	4 (0,008)	24 (0,048)	4,68	1,1 [0,9-1,3]	0,8 [0,6-1,1]
4	518	80 (0,15)	4 (0,008)	25 (0,048)	3,61	1,3 [1,1-1,5]	1,7 [1,4-1,9]

^aLa prueba de la u indica una sobredispersión significativa, $u > 1,96$; o subdispersión, $u < 1,96$. Las estimaciones de las dosis se derivan de los dicéntricos y las traslocaciones bidireccionales.

Para calcular las dosis se utilizó una curva de calibración aguda ($0,5 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$) *in vitro* de ⁶⁰Co para dicéntricos y anillos. Para las personas 1 y 2, la reconstrucción de la dosis física sugería una irradiación muy localizada, que no fue confirmada por la distribución de dicéntricos por célula ($u < 1,96$, cuadro 13). Por consiguiente, las dosis que se calcularon con la presunción de que la exposición había sido aguda y homogénea son muy inferiores a las estimaciones de las dosis para las personas 3 y 4, en las que las aberraciones presentaban distribuciones sobredispersas ($u > 1,96$), lo que sugería que la exposición del cuerpo había sido parcial. Ello concuerda con las circunstancias de la exposición según se reconstruyeron por dosimetría física.

Los cuatro pacientes posiblemente sufrían linfocitopenia antes de su llegada a Francia y, por consiguiente, en las estimaciones promediadas de las dosis impartidas a todo el cuerpo, basadas en aberraciones inestables (sección 9.7.7.4), probablemente se subestime la dosis. En consecuencia, también se realizó la prueba de traslocaciones con FISH, considerando la totalidad de las células en lugar de limitarse a las células estables. Se pintaron tres parejas de cromosomas (N^{os} 2, 4 y 12) junto con una sonda pancentromérica. En la persona 2 no se observó diferencia en las dosis estimadas utilizando dicéntricos o producciones de traslocaciones (cuadro 13). Para las personas 1 y 4, los valores FISH eran superiores a los de dicéntricos, pero las diferencias no eran estadísticamente significativas. En cambio, para la persona 3 la dosis estimada con los dicéntricos fue superior. Esas diferencias probablemente se expliquen por la heterogeneidad y el fraccionamiento de las exposiciones, que diferían marcadamente entre los pacientes y que, por consiguiente, modificaban las distribuciones de traslocaciones en las células inestables, afectando por lo tanto a la desaparición relativa de los dicéntricos respecto de las traslocaciones.

Se realizaron nuevas pruebas citogenéticas de seguimiento (figuras 33 y 34) si bien no siempre se dispuso de muestras de todas las personas.

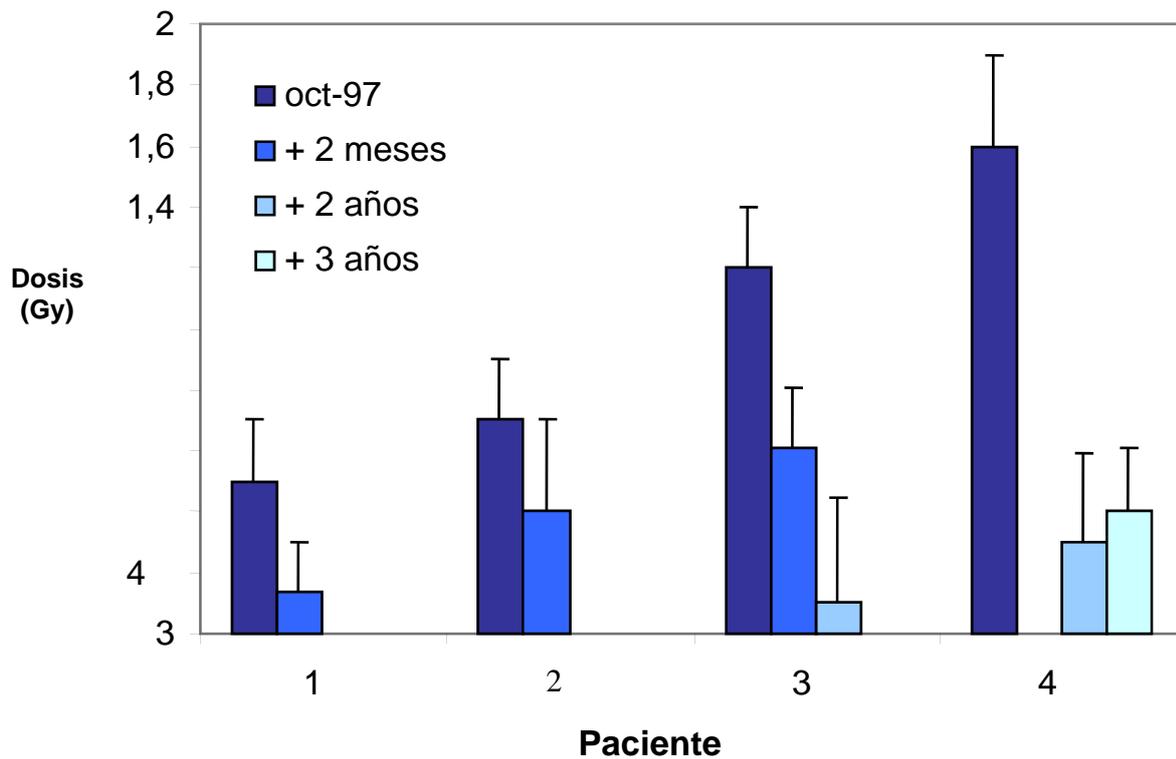


Fig. 33. Cambios de las estimaciones de la dosis obtenidas a partir de dicéntricos, en función del tiempo transcurrido desde la irradiación.

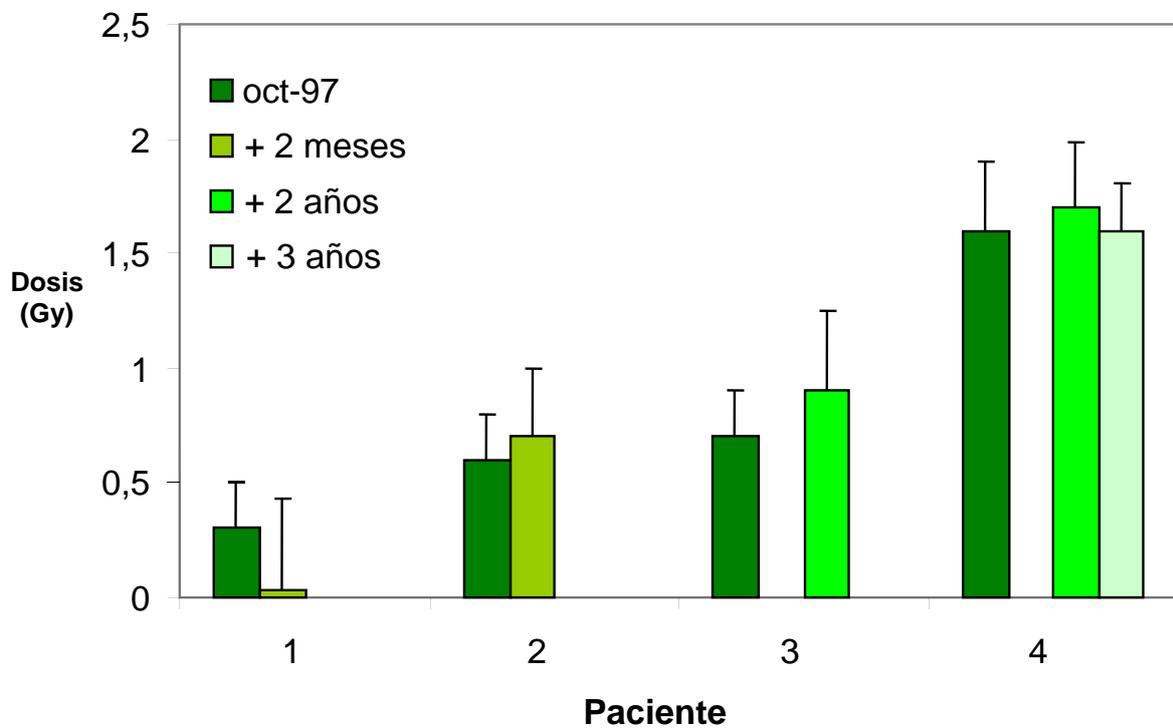


Fig. 34. Cambios en las estimaciones de la dosis obtenidas a partir de traslocaciones bidireccionales, en función del tiempo transcurrido desde la irradiación.

Como se preveía, se observó una disminución de la producción de dicéntricos a lo largo del tiempo en todos los pacientes. Por el contrario, no se observó descenso de la frecuencia de traslocaciones bidireccionales en tres de los cuatro pacientes. Para la persona 1 la frecuencia de traslocaciones disminuyó dos meses después de la obtención de la primera muestra de sangre pero, habida cuenta de las incertidumbres, el hecho no era estadísticamente significativo. La estabilidad general de los últimos datos de traslocaciones probablemente sea un reflejo del rápido recambio de los linfocitos asociado a su linfocitopenia y la rápida eliminación de las aberraciones inestables. Los últimos datos FISH probablemente indiquen la dosis recibida por las células madre de la médula ósea.

11. ANÁLISIS CON CONDENSACIÓN PREMATURA DE LOS CROMOSOMAS (PCC)

En general, la dosimetría biológica se realiza analizando los dicéntricos y/o las traslocaciones en la primera mitosis que sigue a la transformación blástica con PHA *in vitro*. Es conocido que esas pruebas presentan varios problemas, a saber, el retraso de la mitosis inducido por la radiación y la mortalidad celular que se registra durante el cultivo de dos días, especialmente en el caso de las altas dosis de radiación, lo que puede propiciar una considerable subestimación de la dosis de exposición a la radiación [250]. En esta sección se describen una serie de técnicas para provocar la condensación prematura de los cromosomas, es decir, antes de que se produzca la primera mitosis, con el fin de reducir o suprimir el tiempo de cultivo y, por consiguiente, la posibilidad de que se retrase la mitosis o se produzca muerte celular.

11.1. PCC POR FUSIÓN MITÓTICA

La inducción de la PCC fusionando linfocitos humanos con células mitóticas de ovario de hámster chino (CHO) en presencia de un agente fusionante (macrogol (PEG)) posibilita la medición de las aberraciones cromosómicas inmediatamente después de la irradiación sin necesidad de estimular la mitosis ni realizar cultivos [66]. El uso de este método de PCC, en combinación con técnicas convencionales tales como el bandeo C o FISH con genotecas de ADN específicas para determinados cromosomas, con o sin sonda pancetromérica, permite detectar las roturas, dicéntricos y anillos, así como las traslocaciones. Se ha propuesto utilizar esta prueba a modo de instrumento biodosimétrico mediante el análisis de las frecuencias de aberraciones cromosómicas, es decir, los dicéntricos, traslocaciones y roturas en exceso [67, 72, 75, 250]. Se trata de una prueba práctica para determinar la exposición a dosis bajas, así como en caso de exposiciones potencialmente mortales a dosis altas y agudas de radiaciones de baja y alta TLE. Además, con ella se pueden distinguir con exactitud las exposiciones totales y parciales del cuerpo [75]. Dado que en esta prueba de PCC, la cifra de células normales refleja más exactamente la proporción de linfocitos no irradiados, el método detecta de forma eficiente incluso pequeñas fracciones no irradiadas (hasta de solo el 5 % del cuerpo). Asimismo, la prueba podría también cuantificar mejor las quemaduras pequeñas y localizadas causadas por exposiciones parciales del cuerpo.

11.1.1. Condiciones para el cultivo y la fusión celular

11.1.1.1. Uso de células mitóticas CHO

Antes de realizar el análisis PCC hay que preparar células mitóticas de ovario de hámster chino (CHO). Lo habitual es crear los cultivos de células CHO a partir de líneas celulares ya preparadas, que son muy fáciles de manejar y presentan un ciclo celular breve, de aproximadamente 12 horas. Las células CHO se pueden cultivar en frascos o botellas rotatorias para 750 mL, en un medio completo (compuesto por F-10, 15 % de suero de ternera recién nacida y antibióticos). Se pueden obtener células mitóticas agregando Colcemid (en una concentración final de 0,1 µg/mL) durante 4 a 6 horas, cuando los cultivos se han llenado hasta la mitad, seguido de agitación mitótica. De cada frasco o botella rotatoria se pueden aislar células mitóticas varias veces al día; por consiguiente, después de cada aislamiento habrá que agregar medio fresco con Colcemid en los recipientes que contienen las células restantes. Se pueden preparar por adelantado grandes cantidades de células mitóticas, que se conservarán en un congelador entre -80 y -110 °C hasta su uso.

11.1.1.2. Aislamiento de linfocitos

En general, para el aislamiento de linfocitos hay que utilizar Ficoll Hypaque, como se describe en la sección 9.1.5.2. Ello presenta la ventaja de que si se aíslan suficientes linfocitos, una parte se puede utilizar inmediatamente y el resto, si es necesario, se puede congelar entre -80 y -120 °C para su uso en el futuro.

11.1.1.3. Agente de fusión

En general hay que utilizar macrogol (PEG) de un peso molecular de 1450, siendo la concentración deseada para la fusión del 40 % al 50 % m/v (en medio F-10 sin suero, PBS, o preferiblemente en medio RPMI-1640 con HEPES sin suero).

11.1.1.4. Procesos de fusión y de condensación cromosómica

Para inducir la condensación prematura de los cromosomas hay que fusionar linfocitos con células CHO mitóticas (proporción 5:1) que posean un factor promotor de la mitosis en presencia de PEG. El proceso de fusión tarda solo 4 minutos (1 minuto en PEG solo, agregando luego gradualmente medio de lavado F-10). A continuación se incuba durante una hora en medio completo con Colcemid a 37 °C [67, 72, 251].

11.1.1.5. Procedimientos de fijación

En principio, el procedimiento es similar al método utilizado para las metafases (sección 9.2) pero variando ligeramente el cronograma y las concentraciones óptimas. Hay que tratar los linfocitos con una solución hipotónica de KCl (0,075M) y mantenerlos en un baño María precalentado (a 37 °C) durante 3 o 4 min; después se centrifuga y se fijan las células con una mezcla de ácido acético y metanol (1:3).

La preparación de los portaobjetos se realiza aplicando la técnica estándar similar a las pruebas descritas anteriormente (véase la sección 9.2).

11.1.1.6. Procedimientos de tinción

La elección de la técnica de tinción dependerá del efecto biológico que se quiera analizar, como sigue:

1) Análisis convencional de roturas cromosómicas.

Para analizar aberraciones cromosómicas tales como las roturas de cromosomas inducidas por la radiación se pueden teñir las preparaciones con Giemsa convencional (R66 mejorado de Gurr) o según la técnica FPG descrita en la sección 9.3.2 (figura 35) [67, 252]. El protocolo con FPG se preparó para PCC con células en las que los dos complementos cromosómicos fusionados estaban totalmente entremezclados. Probablemente no sea necesario para la técnica de linfocitos que se describe aquí, puesto que los dos conjuntos de cromosomas tienden a mantenerse en dos grupos, como se muestra en la figura 35, en la que se distinguen claramente los cromosomas humanos monocatenarios. Un inconveniente de la tinción FPG es que los cromosomas tienden a hincharse, lo que puede entorpecer el recuento exacto de fragmentos PCC, pues si dos objetos pequeños y engrosados adyacentes se tocan, pueden dar la impresión de que forman una sola estructura.



Fig. 35. G₀ humana sometida a PCC en la que se señalan con flechas algunos fragmentos producidos por el método de fusión mitótica.

2) Análisis de dicéntricos con bandeo C.

Además de las roturas cromosómicas también se pueden visualizar los dicéntricos. Para ello hay que pretratar las preparaciones con hidróxido de bario y solución salina (sección 9.3.3), seguido de tinción con Giemsa, que destaca la región centromérica de todos los cromosomas, para que los dicéntricos se distinguieran fácilmente de los monocéntricos (figura 36) [70, 79].

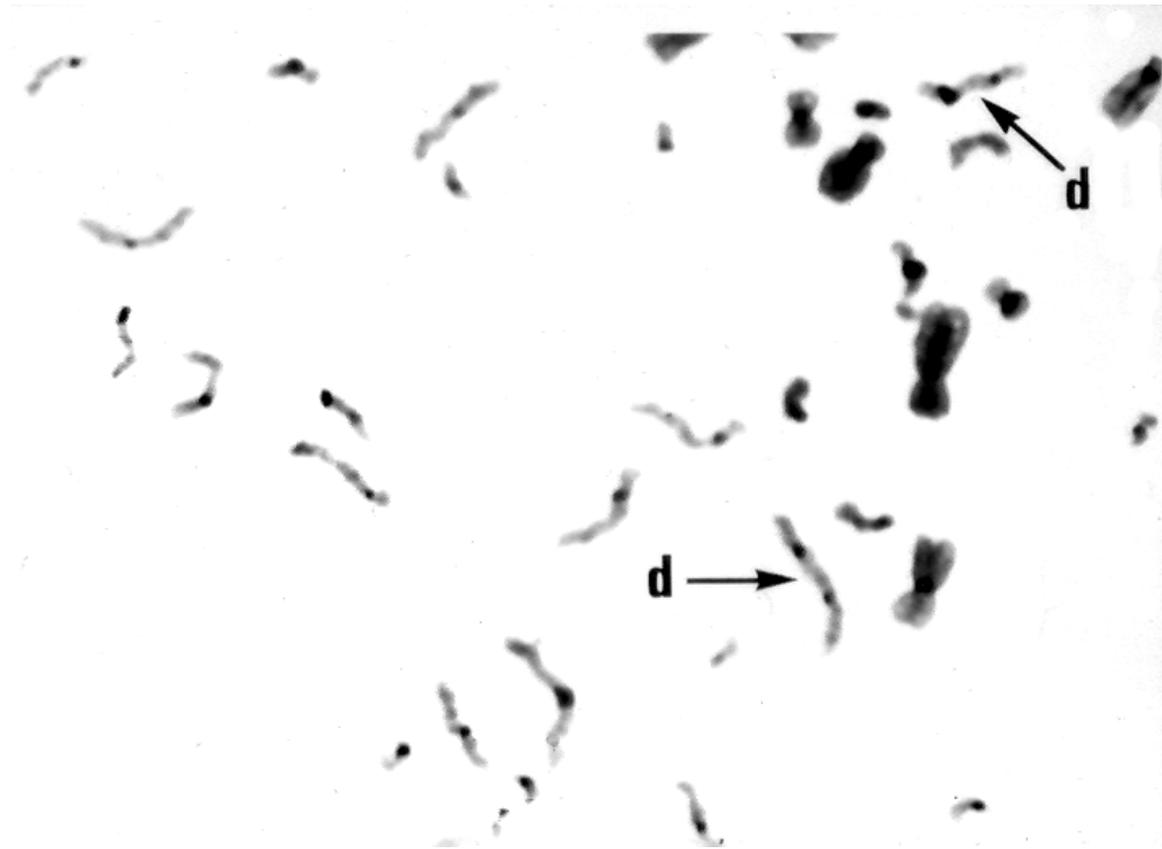


Fig. 36. Preparación PCC teñida con el método de bandeado C donde se distinguen dos dicéntricos (d).

3) Análisis de traslocaciones y dicéntricos con la prueba de pintado cromosómico.

La frecuencia de traslocaciones y dicéntricos inducidos por la radiación también se puede determinar con preparaciones PCC utilizando la técnica FISH, ya sea solo con sondas de pintado cromosómico o en combinación con una sonda pancentromérica (figura 37), que permite distinguir con más exactitud las traslocaciones de los dicéntricos [72].

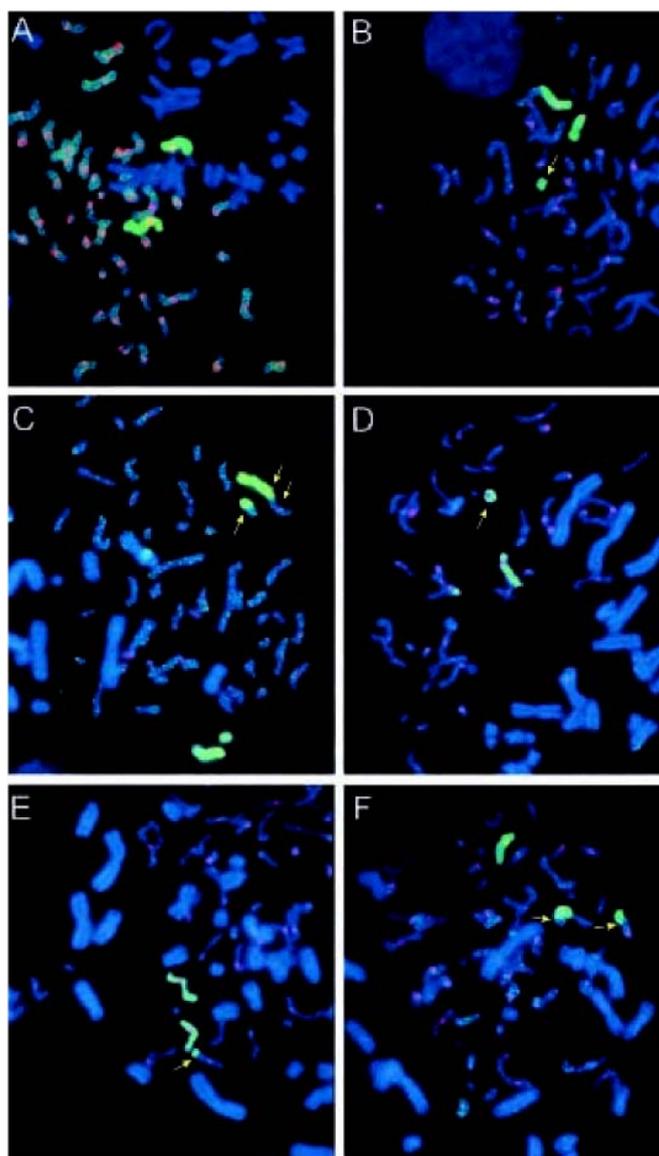


Fig. 37. Preparación PCC con FISH bicolor, la combinación de pintado cromosómico (Nº 8) y una sonda pancentromérica para todo el genoma. (A) En una PCC normal de control no irradiada. En células irradiadas, las flechas indican (B) exceso de roturas en PCC, ace(b); (C) dicéntrico, dic (BA), fragmento bicoloreado, ace(ba); (D) anillo, r(B); (E), (F) traslocación terminal, t(BA) y t(AB) [8].

11.1.2. Análisis

Los criterios de análisis son en parte similares a los descritos en la sección 9.4 (es decir, codificación de las preparaciones, parámetros de examen, etc.). Las extensiones PCC se pueden localizar a mano o recurriendo a sistemas automatizados de detección de metafases, de uso más general (sección 13.3) [75]. Se recomienda facilitar el examen utilizando un sistema de registro que permita señalar todas las piezas cromosómicas en un dibujo o imagen de la extensión PCC. Se puede adaptar al microscopio un dispositivo (cámara lúcida) que presenta las extensiones con gran ampliación y con el que se puede dibujar y hacer anotaciones en la imagen. Algunos sistemas de detección de metafases disponen de aplicaciones que permiten agregar anotaciones en las imágenes digitalizadas. Hay que anotar las coordenadas de platina de las posiciones que ocupan las extensiones PCC en los portaobjetos y el método de selección de las extensiones susceptibles de examen no debe introducir sesgos que distorsionen la producción de aberraciones.

El análisis entraña el recuento del número de elementos cromosómicos, que al poseer una sola cromátida se distinguen fácilmente de los cromosomas mitóticos CHO en las extensiones PCC de interfases humanas teñidas con Giemsa. Si se utiliza la técnica FPG, los cromosomas humanos aparecen teñidos de oscuro, mientras que las células CHO, que se han cultivado durante más de dos ciclos celulares en un medio enriquecido con BrdU, aparecen arlequinados y con una tinción muy suave (véase la figura 22). Si se aplica la prueba FISH, se puede utilizar ADN cot-1 de hámster para enmascarar todas las señales de los cromosomas CHO, de modo que solo destaquen los PCC humanos apropiados (figura 37).

11.1.3. Criterios de examen

Se puede aprovechar la apariencia de la PCC para determinar fácilmente la posición del ciclo celular en que se encontraban los linfocitos en el momento en que se trataron. Las células que se encontraban en G₁, S y G₂ aparecerán, respectivamente, en forma de cromosomas monocromatídicos, pulverizados o bicromatídicos. A efectos de dosimetría biológica con preparaciones teñidas con Giemsa, se examinan solo las preparaciones las extensiones que presentan una sola cromátida, es decir, los linfocitos humanos que han sido tratados en G₀/G₁, en los que cada elemento corresponde a un cromosoma humano (figura 35).

Por consiguiente, en los linfocitos no irradiados se contarán 46 elementos. Se registra la cifra de elementos cromosómicos de las muestras expuestas y la frecuencia inducida se calcula simplemente restando el valor obtenido en las muestras no tratadas. Para los casos de presunta exposición parcial del cuerpo se ha introducido un método de análisis alternativo, Qpcc, consistente en el análisis de la producción de fragmentos PCC en exceso en las células dañadas (que contienen fragmentos PCC en exceso) [75]. El fundamento conceptual del método es el mismo que el del método Qdr introducido por Sasaki y Miyata [142] (véase la sección 9.7.4.3). Después de aplicar un bandeado C o utilizar una sonda pancentromérica y genotecas de ADN específicas para los cromosomas utilizando la técnica FISH, se examina, registra y analiza la presencia de dicéntricos y/o traslocaciones en las preparaciones (véase la figura 37), según se describe en las secciones 9.4 y 10.4.

11.2. PCC POR INDUCCIÓN QUÍMICA

11.2.1. Prueba rápida de cromosomas interfásicos (RICA)

Con esta prueba se elude también la necesidad de realizar cultivos prolongados. Se aíslan linfocitos de la sangre con el método de Ficoll Hypaque (sección 9.1.5.2) y se cultivan en un medio que contenga un inhibidor de la fosfatasa tal como el ácido okadaico o caliculina A, trifosfato de adenosina y p34^{cdc2}/cinasa de la ciclina B, y se incuban a 37 °C durante solo 3 horas. Prasanna *et al.* [76] han descrito el protocolo completo. Se fija y se extiende la preparación (cloruro potásico hipotónico; metanol: ácido acético, 3:1; goteo en un portaobjetos limpio) después de los procedimientos normales utilizados para las metafases.

Seguidamente se realiza una hibridación *in situ* y se aplica el pintado cromosómico, y las lesiones inducidas por la radiación se analizan mediante microscopía de fluorescencia (figura 38).

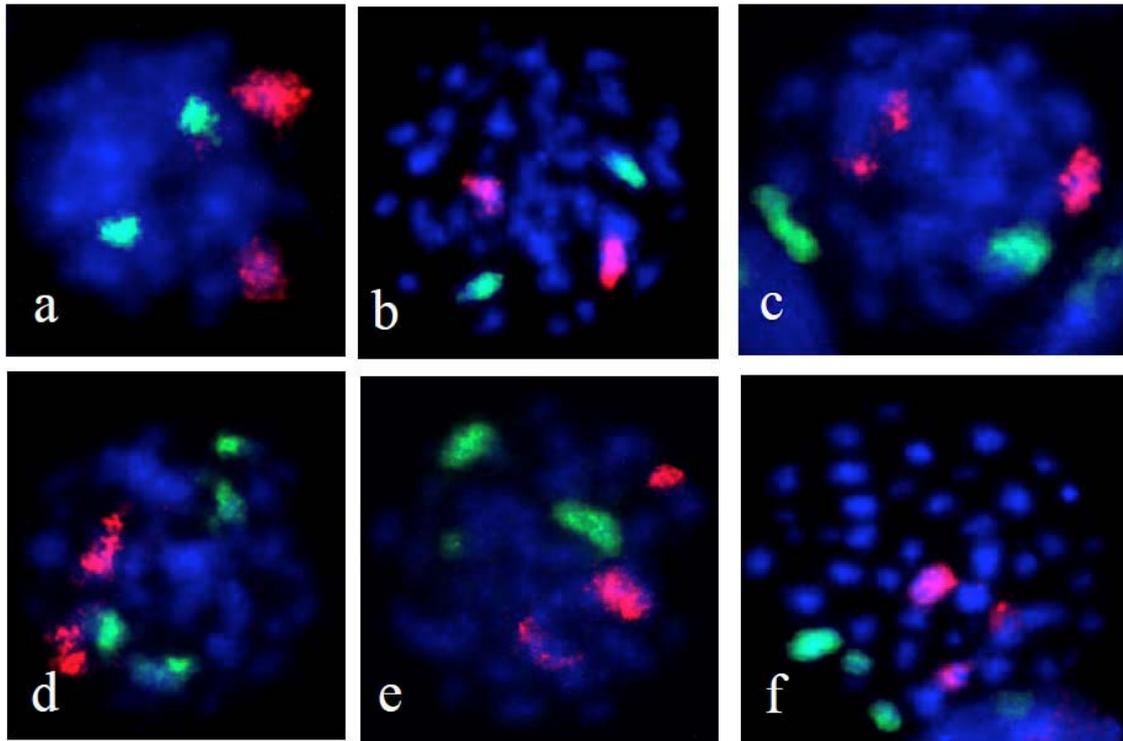


Fig. 38. Microfotografías de los cromosomas humanos N° 1 (rojo) y 2 (verde) pintados con FISH en linfocitos irradiados con rayos γ y de ^{60}Co visualizados mediante la prueba rápida de cromosomas interfásicos (RICA) [78]. (a y b): células normales con dos manchas rojas y dos manchas verdes; (c): cromosoma 1 aberrante que forma más de dos manchas rojas; (d): cromosoma 2 aberrante que forma más de dos manchas verdes; (e y f): células con más de dos manchas verdes y dos manchas rojas (cortesía de Pathak y Prasanna, AFRRRI, EE.UU.).

Las células normales presentan dos manchas fluorescentes por cromosoma, mientras que las células con aberraciones estructurales (roturas e intercambios) que afecten a los cromosomas correspondientes a las sondas de pintado pueden presentar más de dos manchas. A efectos de dosimetría biológica es adecuado utilizar una sonda de gran tamaño que corresponda a un solo cromosoma [76]. Sin embargo, si se utilizan sondas para más de un cromosoma aumenta la sensibilidad [78].

11.2.2. Prueba de anillos PCC

Entre los métodos de PCC inducida por medios químicos a efectos de dosimetría biológica, un procedimiento simple y útil consiste en recontar los anillos presentes en cromosomas teñidos con Giemsa. En esta técnica sigue siendo necesario cultivar los linfocitos, y en el método, descrito por Kanda *et al.* [68], se recomiendan los cultivos de 48 horas. Por consiguiente, la prueba de anillos con PCC no ahorra tiempo, pero es particularmente aplicable a las sobredosis altas en el margen donde la respuesta a la dosis de la prueba de dicéntricos convencional muestra signos de saturación. Se ha calibrado y utilizado para dosis equivalentes de hasta 20 Gy a rayos X. A esa dosis, el número de dicéntricos y fragmentos inducidos es demasiado elevado para que el recuento sea fiable. Sin embargo, en los linfocitos, los anillos se inducen con frecuencias muy inferiores, a menudo de ~10 % de las de los dicéntricos, de modo que el recuento de anillos es un efecto fiable tras la aplicación de dosis muy altas.

11.2.2.1. Cultivo celular, tratamiento químico y obtención de las preparaciones

El protocolo se describe paso a paso en el anexo III.

Preparación de los productos químicos

Hay que preparar inhibidores de la fosforilación del ADN tales como el ácido okadaico o caliculina A. Se trata de productos químicos carcinógenos que, por consiguiente, hay que manejar adoptando las debidas precauciones de seguridad. La caliculina A puede inducir la PCC con una eficacia 20 veces mayor que el ácido okadaico, si bien sus mecanismos de inducción de la PCC probablemente sean similares, a juzgar por la dependencia de la dosis y la morfología cromosómica resultante. El ácido okadaico o la caliculina A se disuelven en dimetil sulfóxido (DMSO), se diluyen con medio y se mantienen a -20 °C como solución madre (por ejemplo, de 5 a 10 µM).

Cultivo

En general, la PCC inducida químicamente en linfocitos requiere que las células realicen ciclos. Por consiguiente, el procedimiento consiste en estimular las células con PHA y cultivarlas durante 48 horas siguiendo un método similar al descrito en la sección 9.1 para obtener metafases. Si bien la PCC se puede inducir en cultivos de sangre entera, el uso de linfocitos aislados proporciona preparaciones más limpias, con gran número de células (se describe en la sección 9.1.5.2). Por lo tanto, especialmente en el caso de las exposiciones a dosis muy altas, se recomienda vivamente aislar los linfocitos.

El protocolo estándar para inducir la PCC es agregar ácido okadaico (500 nM) o caliculina A (20–50 nM) a los cultivos durante la última hora, obteniéndose una mezcla de células PCC en todas las fases del primer ciclo celular. Sin embargo, puede que la eficacia de los productos químicos dependa de las condiciones de cultivo y de la calidad de los fármacos. La concentración y el periodo del tratamiento óptimo se determinarán sobre la base de la incidencia de células con PCC y la calidad de la morfología de los cromosomas en cada laboratorio. Si el tratamiento es insuficiente no habrá células analizables, y si es excesivo los cromosomas aparecerán borrosos y demasiado condensados. Los procedimientos de fijación, preparación de los portaobjetos y tinción son similares a los utilizados para las metafases.

11.2.2.2. Criterios de examen

En los cultivos de 48 horas de linfocitos muy irradiados, la mayoría de las células analizables se encuentran entre la fase G₂ tardía y la metafase. En las exposiciones con dosis bajas puede haber contaminación de células en anafase. Comparados con la apariencia de los cromosomas en anillo de las extensiones de metafases (figura 11), los anillos PCC de las células en G₂ tardía y anafase (figura 39A) son estrechos, lo que permite identificarlos fácilmente. Por lo tanto, se prefiere esas células para recontar los anillos PCC. Las células en fase G₂ tardía y las células en anafase se distinguen porque en ellas las cromátidas están unidas o separadas, respectivamente (figura 39B).

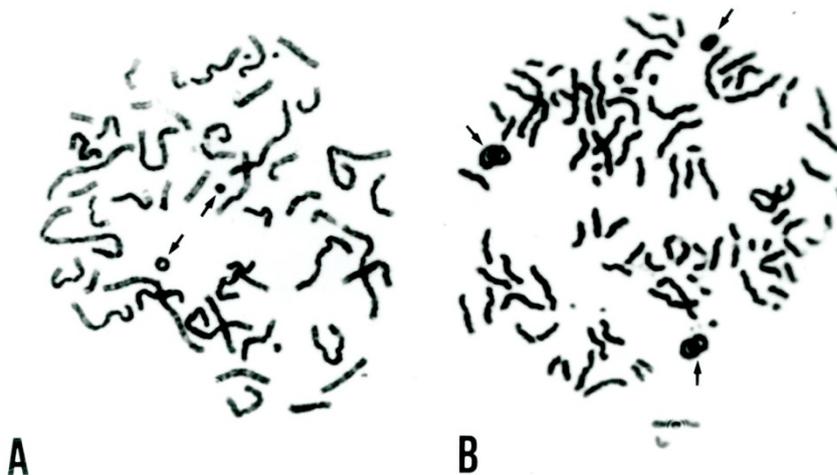


Fig. 39. Ejemplos de PCC inducida con ácido okadaico en diferentes fases del ciclo celular en linfocitos irradiados. (A) Células PCC G₂/M, (B) células PCC M/A en las que se observan las cromátidas hermanas separadas. Las flechas señalan los cromosomas en anillo [68].

Las frecuencias de anillos PCC no difieren significativamente entre las células en G₂ tardía y las células en anafase, y los datos se pueden agrupar.

Los cromosomas con forma circular se contabilizarán como anillos PCC. Los centrómeros no se visualizan claramente en las células PCC teñidas solo con Giemsa, razón por la cual los anillos PCC no se clasifican como formas céntricas o acéntricas.

Al igual que en el caso de los dicéntricos (sección 9.7.4.3) el análisis comparativo de la distribución intercelular de anillos PCC respecto de la distribución de Poisson informa sobre la uniformidad de la exposición a radiaciones de baja TLE o de la calidad de la radiación emitida en un accidente. Cuando media un intervalo de tiempo entre la irradiación y la obtención de las muestras de sangre, por ejemplo si se descubren los casos con retraso, se debería poder utilizar un cálculo del período de semidesintegración para ajustar la producción observada con el fin de obtener una estimación de la frecuencia original de anillos PCC. En estos momentos se dispone de pocos datos en respaldo de esta afirmación. Sin embargo, en el estudio citogenético de seguimiento de un superviviente del accidente de Tokai-mura se notificó un período de semidesintegración de alrededor de 8,7 meses [253].

11.3. ACCIDENTE DE RADIACIÓN INVESTIGADO CON EL MÉTODO DE LOS ANILLOS PCC

Poco después de la publicación de la técnica de los anillos PCC, calibrados *in vitro* con rayos X de 200 kV, [68] se presentó la ocasión de examinar un grave accidente radiológico utilizando el método, en el que la PCC se indujo con ácido okadaico. Se realizó la dosimetría biológica en tres víctimas gravemente expuestas del accidente de criticidad ocurrido en Tokai-mura (Japón) en 1999 [254].

Las frecuencias de anillos PCC por 100 células de muestras obtenidas 9 horas después del accidente fueron de 150, 77 y 24, que dieron unas estimaciones de la dosis de, respectivamente, >20, 7,4 (95 % C.I. 6,5–8,2) y 2,3 (1,8–2,8) Gy-Eq. Hay que tener presente que las exposiciones lo fueron a un campo mixto de radiación gamma y neutrones, y que a dosis tan altas no es apropiado utilizar la dosis equivalente medida en Sv (sección 2), porque esta se basa en la consideración de los riesgos de los efectos estocásticos a dosis bajas. La dosis impartida a un órgano ponderada para la EBR se definió especialmente para caracterizar la exposición a una dosis alta como el producto de la dosis a un órgano absorbida y la EBR,

con el fin de evaluar el desencadenamiento de los efectos deterministas en la salud [15]. La EBR de rayos X de 200 kV X se fija en 1. La unidad de la dosis ponderada para la EBR es el $J\ kg^{-1}$, que en [15] se denomina equivalente gray (Gy-Eq). Para la persona más irradiada, la dosis solo se pudo aproximar a >20 Gy-Eq, porque la calibración *in vitro* publicada [68] presentaba una nivelación (saturación) en la curva de dosis-respuesta lineal cuadrática para la dosis para el cuerpo entero ponderada para la EBR cercana a 20 Gy-Eq de rayos X de 200 kV (o 20 Gy de dosis absorbida por el cuerpo entero, ya que la EBR es igual a 1).

Se realizaron también análisis paralelos de las muestras de sangre mediante el recuento convencional de dicéntricos y anillos (dic+rc) en metafases. Al haberse producido exposiciones tan altas, con la consiguiente rápida caída de los recuentos de linfocitos periféricos, las células se cultivaron aplicando un método que maximiza la probabilidad de obtener metafases [123]. El método concentra los linfocitos utilizando una columna Ficoll Hypaque y es similar al descrito en la sección 9.1.5.2. Se obtuvieron así, para el paciente que había recibido la radiación más intensa, 715 dicéntricos y 188 anillos céntricos + acéntricos en 78 células en las que todas las metafases presentaban lesiones. Las producciones correspondientes para las otras dos personas fueron de 479 dicéntricos y 55 anillos en 175 células y 191 dic + rc en 300 células. En el cuadro 14, tomado de [255], se resumen las estimaciones de las dosis obtenidas con métodos citogenéticos y mediante mediciones físicas con análisis por activación con sodio.

CUADRO 14. COMPARACIÓN DE LAS DOSIS CALCULADAS MEDIANTE DIVERSOS INDICADORES

Paciente	Dosis estimada para el cuerpo entero ponderada para la EBR (Gy-Eq) ^a mediante			
	Anillos PCC	Dic	Dic+R/Rc	²⁴ Na ^b
A	>20	22,6	24,5	17-24
B	7,4(6,5-8,2)	8,3	8,3	8,7-13
C	2,3(1,8-2,8)	-	3,0(2,8-3,2)	2,5-3,6

^a EBR fijada en 1 para rayos X (pacientes A y B) o rayos γ (paciente C).

^b Ishigure *et al.* [255], donde la EBR de neutrones se evalúa en 1,5-2,0.

12. PRUEBA DE MICRONÚCLEOS CON BLOQUEO DE LA CITOCINESIS (CBMN)

12.1. ANTECEDENTES

La radiación ionizante induce la formación de fragmentos cromosómicos acéntricos y, en pequeña medida, la segregación incorrecta de los cromosomas enteros. Los fragmentos cromosómicos acéntricos y los cromosomas enteros que no interactúan con el huso quedan rezagados en la anafase y en consecuencia no se integran en los núcleos hijos principales. Los fragmentos cromosómicos, o cromosomas enteros, rezagados forman un pequeño núcleo independiente, el denominado micronúcleo.

La prueba de MN de linfocitos de la sangre periférica basada en la expresión de MN en cultivos de linfocitos a corto plazo fue descrita por primera vez por Countryman y Heddle [82]. Sin embargo, en la versión original del método no se hizo intento alguno de determinar si las células examinadas habían completado la división celular *in vitro*, lo que restaba fiabilidad a la prueba, pues las lesiones cromosómicas solo se expresan en forma de micronúcleos si la célula se divide. En última instancia se elaboró un planteamiento más fiable en el que se recurre al uso de un inhibidor de la citocinesis, la citocalasina B. Con citocalasina B, Fenech y Morley lograron demostrar en 1985 [83, 84] que las células que habían completado una división nuclear se podían acumular y se distinguían en forma de células binucleadas (BN). De ese modo, en las células BN se podían recontar los MN de forma específica y eficiente excluyendo las células mononucleares que no se habían dividido y que no podían haber expresado MN *in vitro* (figura 19). En consecuencia, los resultados obtenidos en la prueba de MN no se ven confundidos por las variaciones interindividuales e interexperimentales de la frecuencia de células que se dividen, que, como se ha comprobado, influye profundamente en la frecuencia de MN observada [84, 256, 258]. La prueba de MN con bloqueo de la citocinesis (CBMN) resultante se ha convertido en el método estándar de medición de los MN en linfocitos cultivados.

Los linfocitos obtenidos de la muestra de sangre son, ellos mismos, resultado de divisiones celulares *in vivo*. Por consiguiente, cabría esperar que algunos de ellos ya contengan MN. En efecto, se ha comprobado que el recuento de MN en linfocitos mononucleados de extensiones sanguíneas convencionales podría ser particularmente útil para supervisar los daños genéticos en poblaciones expuestas crónicamente [259–263]. Además, el recuento de los MN en células mononucleadas podría ser también un interesante parámetro adicional en la prueba CBMN [262, 263].

En el decenio de 1990 se puso a punto la prueba CBMN con centrómeros, en la que se utiliza FISH y una sonda centromérica para visualizar los centrómeros. El método permite distinguir los MN que contienen fragmentos acéntricos y cromosomas enteros [69, 85, 263–267]. La aplicación de este método hace posible aumentar sustancialmente la sensibilidad de la prueba en el margen de dosis bajas [85, 266, 267] (véase la sección 12.4.2).

Más recientemente se ha puesto a punto y validado una versión más amplia de la prueba CBMN, denominada prueba de micronúcleos y citoma con bloqueo de la citocinesis (CBMN Cyt), [86] en la que, además de los micronúcleos de las células binucleadas y mononucleadas, se miden también los puentes nucleoplásmicos (NPB, figura 19C) y las protuberancias nucleares de las células binucleadas, que son biomarcadores de cromosomas dicéntricos [89] y de la amplificación génica [86], respectivamente. Además, en la prueba CBMN Cyt se examina la proporción de células mononucleadas, binucleadas y multinucleadas, así como las células apoptóticas, lo que da una medida de la proliferación celular y la muerte celular, datos que pueden ser de interés para la dosimetría biológica [88, 268].

A modo de biomarcadores del daño cromosómico también se pueden recontar los micronúcleos presentes en los eritrocitos, teniendo presente que el método tiene un límite superior de detección de 1 Gy y que las muestras se tienen que obtener lo antes posible después

de la exposición, debido a la inhibición de la eritropoyesis. Recientemente se ha adaptado a su uso en humanos la prueba de MN con citometría de flujo *in vivo* en eritrocitos inmaduros de ratón, limitando el conteo de MN a los reticulocitos que dan positivo para el receptor de la transferrina (Tf-Ret; CD71) [269]. La evaluación de la prueba de reticulocitos en pacientes con cáncer de la tiroides tratados con radioyodo muestra que el método se puede utilizar en el seguimiento personal tras una presunta exposición accidental a la radiación [270, 271].

12.2. CULTIVO DE LINFOCITOS PARA LA PRUEBA CBMN

El método de cultivo de linfocitos es similar al descrito en la sección 9.1 para obtener metafases. Las diferencias principales, sin embargo, son que *i*) se agrega Cyt-B a los cultivos a las 24 o 44 horas (a efectos de dosimetría biológica de la radiación es preferible hacerlo a las 24 horas, para asegurarse de que solo se capturen células de la primera división), *ii*) no se utilizan bromodesoxiuridina ni Colcemid, *iii*) el tiempo de cultivo se prolonga a 72 horas y el tratamiento hipotónico, la fijación y la centrifugación se modifican para conservar el citoplasma, para que se puedan identificar fácilmente las células binucleadas. Las preparaciones se tiñen con Giemsa convencional para microscopía óptica o con un colorante fluorescente tal como naranja de acridina, para microscopía de fluorescencia. Asimismo, las preparaciones se pueden someter a un tratamiento ulterior para destacar los centrómeros mediante FISH y una sonda FISH pancentromérica. En el anexo IV se proporcionan los protocolos pormenorizados.

12.3. CRITERIOS DE EXAMEN DE LA PRUEBA CBMN

Se han publicado [86] criterios de examen pormenorizados para todos los biomarcadores de la prueba CBMN Cyt. En esta sección se dan solo los criterios de examen para MN y NPB de células binucleadas, porque se trata de los biomarcadores mejor validados para dosimetría biológica de la exposición a la radiación ionizante.

12.3.1. Criterios para seleccionar células binucleadas que se pueden examinar para determinar la frecuencia de micronúcleos

Las células con bloqueo de la citocinesis que se pueden examinar para determinar la frecuencia de MN deberían presentar las características siguientes (figura 19):

- a) Deben ser células binucleadas (BN).
- b) Los dos núcleos deben tener las membranas intactas y deben encontrarse dentro de un mismo límite citoplasmático.
- c) Los dos núcleos deben tener tamaños y presentar un perfil de tinción e intensidades de tinción aproximadamente iguales.
- d) Los dos núcleos pueden no presentar conexiones o pueden estar conectados por uno o más puentes citoplásmicos, que no serán más anchos que 1/4 del diámetro nuclear.
- e) Los dos núcleos principales pueden tocarse, pero preferentemente no se deberían solapar. Las células cuyos dos núcleos se solapan solo se examinarán si se distinguen los límites nucleares de los dos.
- f) El límite citoplasmático o la membrana de la célula BN estará intacto y se distinguirá claramente de los límites citoplasmáticos de las células adyacentes.

12.3.2. Criterios para el recuento de los micronúcleos

Los MN son morfológicamente idénticos a los núcleos principales, pero menores (figura 19). También presentan las características siguientes:

- a) El diámetro de los MN en los linfocitos humanos suele variar entre 1/16 y 1/3 del diámetro medio de los núcleos principales, lo que corresponde a entre 1/256 y 1/9 de la superficie de los núcleos principales de la célula binucleada, respectivamente.
- b) Los MN no son refractivos, por lo que se distinguen fácilmente de artefactos tales como las partículas de la tinción.
- c) Los MN no están unidos ni conectados a los núcleos principales.
- d) Los MN pueden tocar los núcleos principales, pero no solaparse con ellos, y el límite de los micronúcleos se debe poder distinguir del límite nuclear.
- e) Los MN suelen presentar la misma intensidad de tinción que los núcleos principales, pero en ocasiones la tinción puede ser más intensa.

En el cuadro 15 se ilustra un formato simple de ficha de recuento de MN.

CUADRO 15. FORMATO DE FICHA DE RECUESTO DE MICRONÚCLEOS CORRESPONDIENTE AL EXAMEN DE DOS CULTIVOS OBTENIDOS POR DUPLICACIÓN (1 Y 2) A PARTIR DE UNA MISMA MUESTRA DE SANGRE

Muestra N°
Examinador:
Fecha:

Prepara- ción N°	Distribución de micronúcleos en células BN							Total de células BN	Total de micronúcleos
	0 MN	1 MN	2 MN	3 MN	4 MN	5 MN	> 5 MN		
1								500	
2								500	
1 + 2								1 000	
Observaciones:									

12.3.3. Criterios para el recuento de los puentes nucleoplásmicos

Un puente nucleoplásmico (NPB) es una estructura continua que contiene ADN y une los núcleos de una célula binucleada. Los NPB se originan a partir de cromosomas dicéntricos (resultantes de la reparación incorrecta de roturas del ADN o de fusiones de extremos de telómeros) cuyos centrómeros son atraídos hacia los polos opuestos durante la anafase (figuras 19A y C). Presentan las características siguientes:

- a) La anchura de los NPB puede variar considerablemente, pero no suele superar 1/4 del diámetro de los núcleos contenidos en la célula.
- b) Los NPB deberían presentar también las mismas características de tinción que los núcleos principales.
- c) En raras ocasiones se observa más de un NPB en una misma célula binucleada.
- d) Las células binucleadas que presenten un NPB pueden contener uno o más MN.
- e) Se pueden observar también células binucleadas con uno o más NPB y ningún MN.

En el cuadro 16 se ilustra un formato simple de ficha de recuento de NPB.

CUADRO 16. FORMATO DE FICHA DE RECuento DE PUENTES NUCLEOPLÁSMICOS CORRESPONDIENTE AL EXAMEN DE DOS CULTIVOS OBTENIDOS POR DUPLICACIÓN (1 Y 2) A PARTIR DE UNA MISMA MUESTRA DE SANGRE

Muestra N°
Examinador:
Fecha:

Preparación N°	Distribución de NPB en células BN							Total de células BN	Total de NPB
	0 NPB	1 NPB	2 NPB	3 NPB	4 NPB	5 NPB	> 5 NPB		
1								500	
2								500	
1 + 2								1 000	
Observaciones:									

Puede resultar más difícil recontar los NPB en células BN cuyos núcleos se toquen, de ahí que sea razonable especificar si los NPB se recontaron en todas las células BN, independientemente de la distancia entre los núcleos, o si se recontaron por separado los de las células BN cuyos núcleos estaban claramente separados y las células BN cuyos núcleos se tocaban. No hay aún datos suficientes para recomendar que se recuenten solo los NPB de las células BN cuyos núcleos no se tocan.

12.4. MANEJO DE LOS DATOS DE LA PRUEBA CBMN

12.4.1. Curvas de dosis-respuesta

Los procedimientos para obtener *in vitro* curvas de calibración dosis-respuesta coinciden con los descritos en la sección 8. Muchos estudios han mostrado que la cantidad de micronúcleos inducidos por la radiación está fuertemente correlacionada con la dosis y la calidad de la radiación [87, 272–275]. Sin embargo, dado que se producen diferencias entre los laboratorios en la respuesta a la dosis en forma de MN, debido al uso de distintos protocolos, criterios de examen, etc., igual que ocurre en las demás pruebas descritas en esta publicación, todo laboratorio que desee realizar dosimetrías biológicas deberá obtener *in vitro* curvas propias de calibración de la respuesta a la dosis. Preferentemente habría que utilizar al menos 8 dosis en el margen hasta los 5 Gy. El ajuste de la curva mediante modelos lineales (alta TLE) y lineal cuadráticos (baja TLE) sigue los procedimientos descritos en la sección 8. En la figura 40 se muestra un ejemplo típico de curva de dosis-respuesta de MN para radiación de baja TLE (rayos γ de ^{60}Co , tasa de dosis de 0,5 Gy/min).

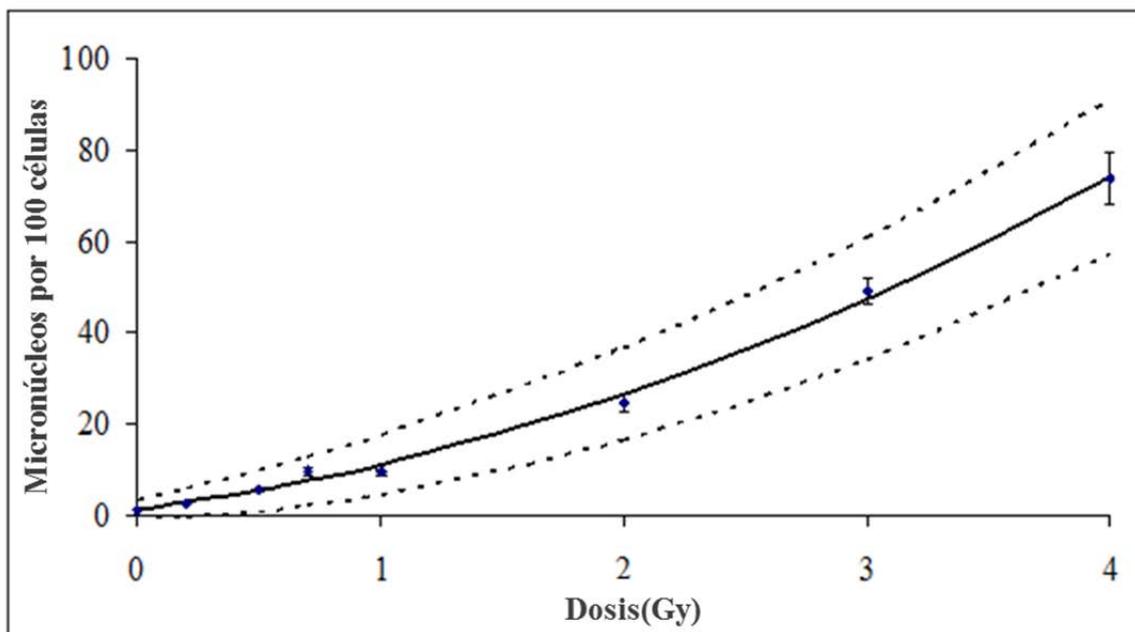


Fig. 40. Curva lineal cuadrática de dosis-respuesta de MN para rayos γ de ^{60}Co . Línea continua: datos combinados de 47 donantes; líneas a trazos: intervalos de confianza del 95 % superior e inferior.

12.4.2. Frecuencia de fondo

Los datos notificados indican que la frecuencia de fondo de MN es bastante variable; se han registrado valores desde 0 hasta 40 por 1 000 células BN [257–286]. Los dos factores que más influyen en la frecuencia de fondo de MN, dejando aparte el régimen alimentario [276] y la exposición a una amplia diversidad de clastógenos y aneuploidógenos, son la edad y el sexo [84, 277].

En estudios de biomonitorización a gran escala se ha comprobado que la producción espontánea de micronúcleos aumenta sistemáticamente con la edad. En un estudio de trabajadores de centrales nucleares y de hospitales se obtuvieron, para una población de control de varones, valores de, respectivamente, 0,35 MN/1 000 células BN/año y 0,44 MN/1 000/año [278–280]. Esos valores concuerdan con el estudio a gran escala de Fenech [108] de las variables que influyen en las frecuencias de referencia de micronúcleos: 0,31 MN/1 000/año. Para una población de control de mujeres se obtuvo un aumento más pronunciado de 0,58 MN/1 000/año [279], también en concordancia con Fenech [108]: 0,52 MN/1 000/año. El análisis de los MN para determinar la presencia de centrómeros utilizando una sonda FISH pancentromérica (figura 41), mostró que el aumento de las frecuencias de referencia de MN se puede atribuir casi en su totalidad a MN que poseen centrómero, reflejo del aumento de la pérdida de cromosomas con la edad [266, 279, 280].

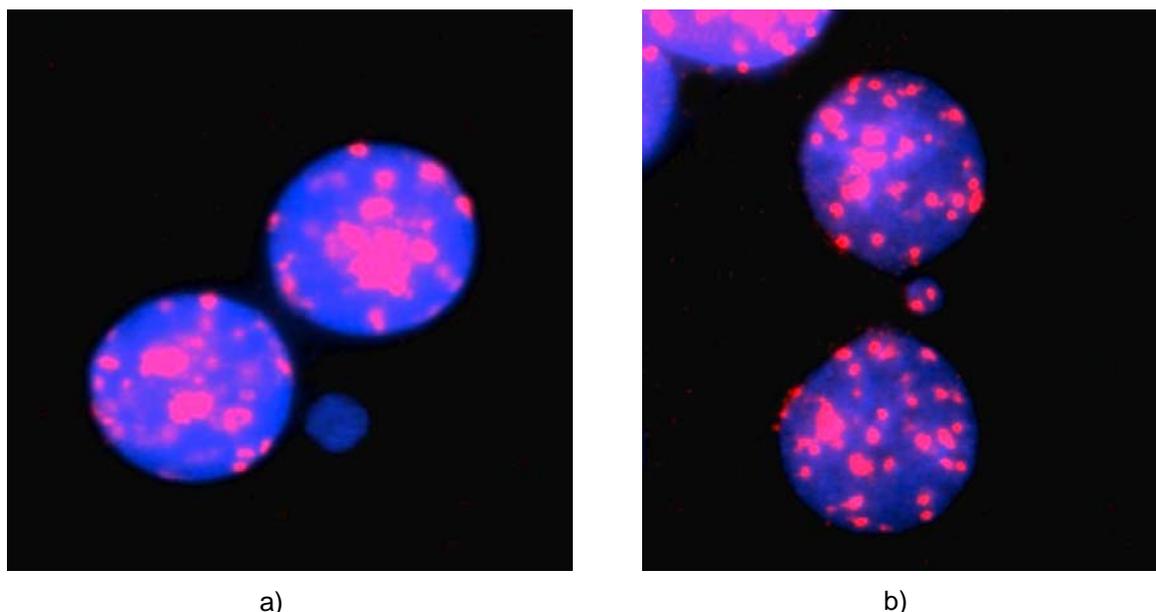


Fig. 41. Células binucleadas en las que se observa un MN carente de centrómero (a) y un MN con centrómero (b). Los centrómeros se han teñido con una sonda pancentromérica (espectro naranja) y los núcleos y MN se han contrateñido con DAPI.

Se puede atribuir casi exclusivamente al cromosoma X la pérdida espontánea de cromosomas [281, 282]. Ello explica también la diferencia entre sexos en las frecuencias de MN espontáneos: para una población de 41,4 y 41,8 años de media de edad, las frecuencias medias de MN espontáneos eran de 16,4 para los varones y 23,5 por 1 000 células BN para las mujeres, respectivamente, mientras que la diferencia en MN carentes de centrómero no era significativa: 6,7 frente a 7,7 [279].

Esta variabilidad de fondo impone claras limitaciones al uso de los MN a modo de dosímetros biológicos para dosis bajas, cuando se desconocen las frecuencias de fondo individuales previas. Se han realizado estimaciones que indican que la prueba CBMN, en su forma más básica, solo podría detectar *in vivo* las exposiciones superiores a 0,2–0,3 Gy de rayos X [87, 266, 283].

Se ha demostrado que la mayor parte de los MN inducidos por la radiación proceden principalmente de fragmentos acéntricos, mientras que los MN espontáneos contienen especialmente cromosomas enteros [85, 264–267]; el uso de la prueba CBMN con centrómeros aumenta sustancialmente la sensibilidad de la prueba CBMN en el margen de las dosis bajas [85, 266]. En los dos estudios [85, 266], en los que se utilizó una sonda pancentromérica, la mayoría de los MN espontáneos contenían centrómeros (MNCM^{+ve}) (73 y 71 %, respectivamente), mientras que la mayoría de los MN inducidos por la radiación carecían de centrómero (MNCM^{-ve}). El número de MNCM^{+ve} mostró solo un leve aumento con la dosis (respectivamente, 3,7 y 5,3 MNCM^{+ve} por Gy por 1 000 células BN). Con un recuento manual de los MNCM^{-ve} en 2 000 células BN se alcanza un límite de detección de 0,1 Gy, con un límite de confianza del 95 % [266, 267].

12.4.3. Índice de división nuclear (NDI)

Al examinar preparaciones de linfocitos con bloqueo de la citocinesis (CB) se observan células que presentan 1, 2, 3, etc., núcleos principales. Se pueden utilizar las frecuencias relativas de las células para definir la progresión del ciclo celular de los linfocitos después de la estimulación de la mitosis.

Se trata del denominado NDI [284]. El índice no es por sí mismo suficientemente robusto para aplicarlo directamente como biosímetro. Sin embargo, a menudo la prueba puede resultar un útil instrumento de investigación para conocer la cinética del ciclo celular de los cultivos. Señalará las perturbaciones que puedan deberse a la exposición a un mutágeno tal como la radiación. Los datos proceden directamente de la prueba CBMN, sin mayor contribución adicional del laboratorio, razón por la cual el método se incluye en la presente publicación.

12.4.3.1. Criterios para el examen de células mononucleadas, binucleadas y multinucleadas viables

Estos tipos celulares tienen las características siguientes:

- Las células mono, bi y multinucleadas son células viables, con el citoplasma intacto y una morfología nuclear normal que contienen uno, dos o más núcleos, respectivamente.
- Pueden contener, o no, uno o más MN o protuberancias nucleares (NBUD) y, en el caso de las células bi o multinucleadas, pueden contener, o no, uno o más NPB.

Las células necróticas o apoptóticas no se deben incluir en el recuento de células viables.

En raras ocasiones se observan células multinucleadas con más de cuatro núcleos si el período del ciclo celular es mucho más breve de lo normal o el tiempo de bloqueo de la citocinesis es demasiado largo.

12.4.3.2. Cálculo del NDI

Se examinan 500 células viables para determinar la frecuencia de células con 1, 2, 3 o 4 núcleos y se calcula el NDI aplicando la fórmula (36):

$$NDI = \frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4}{N} \quad (36)$$

donde:

M_1 a M_4 representan la cantidad de células con uno a cuatro núcleos, y N es la cifra total de células viables examinadas.

Los métodos de cálculo del NDI publicados [284] no consideran su incertidumbre. A decir verdad, no parece que se haya publicado subsiguientemente ningún método para deducir la incertidumbre. Por consiguiente, se describe aquí y, dada su complejidad, en la sección 4 del anexo 4 figura un ejemplo desarrollado en su totalidad.

Dado que los valores de M_1 a M_4 están correlacionados, las incertidumbres del NDI no se pueden calcular aplicando el análisis del error estándar. Por el contrario, hay que tener en cuenta la covarianza, que mide la dependencia mutua de las variables. Se puede aceptar la presunción de que los valores de M_1 a M_4 del NDI forman una distribución multinomial, lo que significa que existe un número determinado (tres o más) de posibles resultados para el número de núcleos de la célula (en este caso, 1, 2, 3 o 4). La varianza (var) y la covarianza (covar) de cada variable, M_1 a M_4 se pueden calcular aplicando las ecuaciones (37) a (39):

$$\text{var}(M_i) = np_i(1 - p_i) \quad (37)$$

$$\text{covar}(M_i, M_j) = -np_i p_j \quad (38)$$

para i y $j = 1, 2, 3$ o 4

donde:

M_1 , M_2 , M_3 o M_4 son los valores de $1 \times M_1$, $2 \times M_2$, $3 \times M_3$ y $4 \times M_4$,
 n es la suma del número total de células multiplicado por las cantidades respectivas de micronúcleos (equivalentes al numerador de la ecuación del NDI), y
 p_i y p_j son las probabilidades de M_i y M_j , que son iguales a M_i o M_j divididas por n .

Utilizando la definición de la covarianza se puede demostrar que la varianza del NDI depende de las varianzas y las covarianzas calculadas aplicando las ecuaciones 37 y 38:

$$\text{var}(NDI) = \sum_{i=1}^4 M_i^2 \text{var}(M_i) + 2 \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 M_i M_j \text{cov}(M_i M_j) \quad (39)$$

El cálculo es relativamente complejo, pero se puede realizar fácilmente utilizando alguno de los conocidos paquetes estadísticos o el programa Dose Estimate mencionado en la sección 8.3.

12.5. APLICACIÓN DE LA PRUEBA CBMN EN DOSIMETRÍA BIOLÓGICA

12.5.1. Estudios de pacientes

Para verificar la aplicabilidad del método CBMN en dosimetría biológica, las producciones de MN se midieron en linfocitos de sangre periférica de 1) diferentes grupos de pacientes de cáncer sometidos a radioterapia fraccionada en parte del cuerpo, por ejemplo, la próstata o el cuello uterino, o por enfermedades como la de Hodgkin [285–288] y 2) en pacientes de cáncer de la tiroides sometidos a tratamiento con radioyodo [289–291].

Los estudios mostraron que la dosis estimada con MN coincidía bastante bien con las dosis promediadas para el cuerpo entero calculadas a partir de los planes de tratamiento con radiación más los histogramas de dosis-volumen [285–287, 292].

Un metaanálisis centrado en pacientes de cáncer de la tiroides [289] mostró que la inducción de MN tras la radiación más que triplicaba la frecuencia previa a la radiación, demostrando así que la prueba CBMN es suficientemente sensible para detectar las lesiones genéticas causadas en los linfocitos circulantes a raíz de la exposición a bajas dosis promedio al cuerpo entero procedentes de fuentes de radiación incorporadas internamente.

12.5.1.1. Estudio de caso con radioyodo

Se utilizó la prueba CBMN para estudiar la respuesta linfocitaria en un varón de 34 años tras un tratamiento de radiación ablativa con ^{131}I consecutivo a una tiroidectomía total por cáncer [291]. Casualmente, varios meses antes de ser diagnosticado, el paciente había proporcionado voluntariamente una muestra de sangre para un estudio *in vitro* de expresión de micronúcleos tras una exposición externa a dosis graduadas de rayos X (198 mGy/min). La frecuencia de fondo (referencia previa al tratamiento) en el cultivo no expuesto fue en promedio de 6,0 MN por 1 000 células binucleadas (BN), mientras que se encontraron valores medios de 18,5, 29,0, 41,0, 61,0 y 75,5 MN por 1 000 células BN tras la aplicación de dosis de rayos X de 50, 100, 150, 200 y 250 mGy, respectivamente. Los datos se ajustaban a una función lineal de dosis-respuesta sin umbral ($Y = 3,714 + 2,783D$; $r=0,99$), como se muestra en la figura 42.

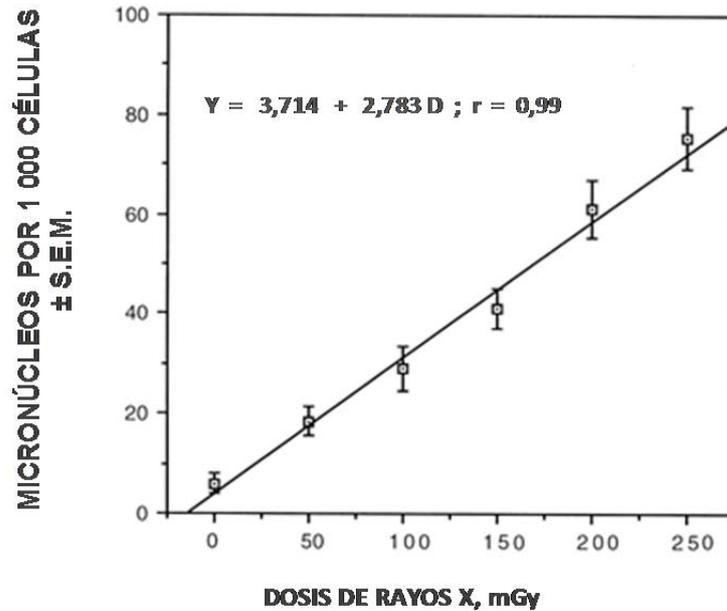


Fig. 42. Curva de dosis-respuesta de MN para dosis bajas de rayos X impartidas a los linfocitos del paciente antes del diagnóstico y después de la terapia con ^{131}I (cortesía de Livingston, REAC/TS, EE.UU.).

Se extrajo sangre 11 días después del primer tratamiento *in vivo* con 48 mCi (1,78 GBq) de ^{131}I y posteriormente a intervalos mensuales, y en última instancia trimestrales hasta cinco años. En la primera muestra posterior al tratamiento se observaron 35,5 MN por 1000 células BN, y la sextuplicación respecto del valor de referencia previo al tratamiento sugiere que la dosis impartida a la sangre periférica fue de alrededor de 110 mGy. A los 26 meses del primer tratamiento con ^{131}I se administró al paciente un segundo tratamiento de 390 mCi (14,46 GBq), que provocó un nuevo aumento de los micronúcleos. El recuento de micronúcleos mostró una gran fluctuación a lo largo del tiempo, siendo unas 10 veces mayor que el valor de referencia previo al tratamiento al cabo de 5 años de seguimiento (figura 43).

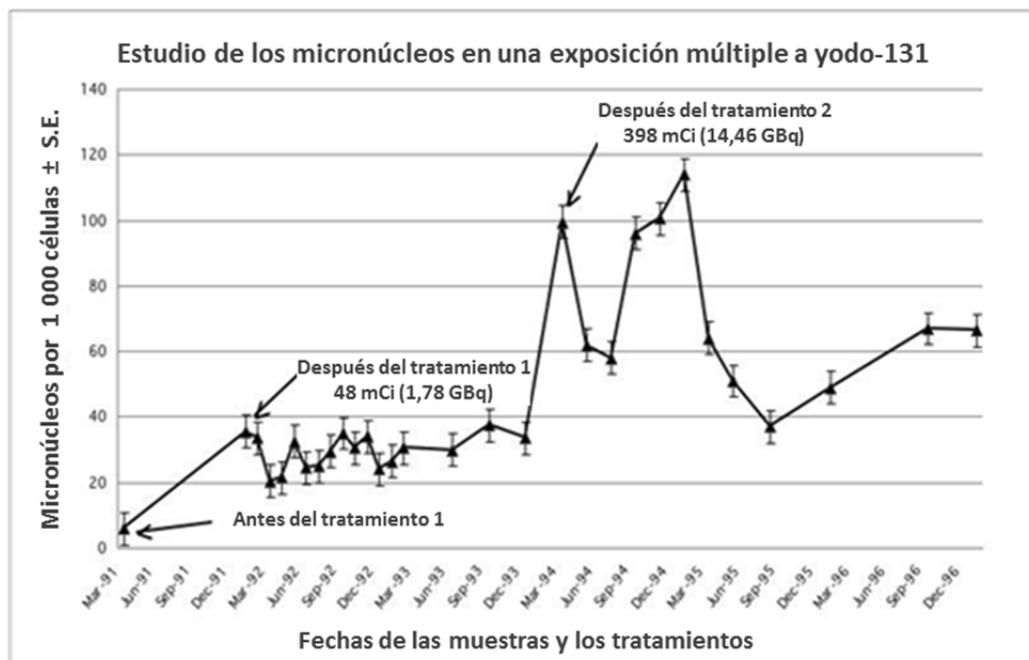


Fig. 43. Seguimiento durante cinco años de los MN del paciente, antes, durante y después de recibir tratamientos con ^{131}I (cortesía de Livingston, REAC/TS, EE.UU.).

Más de 15 años después del segundo tratamiento, el paciente no sufría cáncer y tenía buena salud. Los resultados de este estudio respaldan la conclusión de que la prueba CBMN es un biomarcador rápido, sensible y cuantitativo de la exposición a la radiación. Sin embargo, esos estudios no pueden determinar la dosis local impartida al tejido blanco, que en este caso procedía de las células tiroideas residuales y las metástasis de origen tiroideo.

12.5.2. Estudios de biomonitorización

Tras ser validado como biomonitor *in vivo* en varios estudios de pacientes, la prueba CBMN, así como la CBMN con centrómeros, se han aplicado en la biomonitorización a gran escala de trabajadores expuestos a la radiación, por ejemplo, en plantas nucleares u hospitales [266, 278–280, 293–295]. Esos estudios de biomonitorización han mostrado la dependencia de los MN respecto de la dosis acumulada recibida a lo largo de los años que precedieron a la venopunción. En el estudio de Thierens *et al.* [280] una regresión lineal de las frecuencias individuales de micronúcleos, con corrección del efecto de la edad (véase la sección 12.4.2.), mostró un aumento de 0,0175 MN por 1 000 células BN/mSv con un valor del coeficiente de correlación de Pearson de 0,10. La aplicación de la prueba CBMN con centrómeros en un segundo estudio de trabajadores expuestos a la radiación, de Thierens *et al.* [295], dio casi el mismo aumento de MN con la dosis, 0,025 MN per 1 000 células BN/mGy, demostrando que esta dependencia respecto de la dosis se debe por completo a los MNCM^{ve}, señalando a la acción clastogénica de la radiación ionizante. También en un estudio de Vaglenov *et al.* [296] en un entorno de exposición ocupacional se constató la dependencia de los MN respecto de la dosis. Los autores notificaron un aumento de 0,03 MN por 1 000 células BN/mGy. Los estudios de biomonitorización realizados a gran escala muestran que la prueba de micronúcleos puede evidenciar el daño genético a escala poblacional para dosis acumuladas debidas a exposiciones ocupacionales superiores a 50 mGy.

12.5.3. Estudios de accidentes

12.5.3.1. Accidente de Chernóbil

La prueba CBMN también se ha utilizado con buen resultado para evaluar la exposición prolongada debida a la incorporación de radionucleidos de período largo en habitantes de las vecindades de la central nuclear de Chernóbil. Entre 1989 y 1991 se estudió la frecuencia de MN en linfocitos BN en 80 personas que se encontraban a 100–200 km de Chernóbil en el momento del accidente, en 1986 [297]. En el estudio realizaron recuentos del cuerpo entero para ¹³⁴Cs y ¹³⁷Cs, de modo que la frecuencia de MN se pudiera relacionar con la dosis impartida al cuerpo. El análisis de regresión múltiple de los datos de 80 personas mostró que *a*) las frecuencias de MN estaban asociadas significativamente con el nivel de actividad del radiocesio ($p = 0,004$) y *b*) la dosis interna absorbida estimada (que variaba de 0,6 a 9,2 mGy) se correlacionaba de forma significativa y positiva con la frecuencia de MN ($R = 0,71$).

12.5.3.2. Accidente de Estambul

En accidentes que afectan a un número reducido de personas y en los que no es tan vital obtener resultados deprisa, la mayoría de los laboratorios optan por utilizar la prueba de dicéntricos. De ahí que sea escaso el material publicado que se refiera al uso de los MN como dosímetro biológico poco después de un accidente. Sin embargo, un ejemplo de ello es el accidente ocurrido en Estambul [158, 159] descrito en las secciones 9.7.5.6 y 10.9.3, en el que diez chatarreros fueron irradiados por una fuente de ⁶⁰Co sin blindaje utilizada anteriormente en radioterapia. En los linfocitos obtenidos ~1 mes después de las exposiciones se estudió la presencia de MN con la prueba CBMN, así como la de dicéntricos y traslocaciones FISH. A partir de los datos combinados de dos laboratorios se obtuvieron con los MN estimaciones de

la dosis para ocho de las personas, y los valores, de 0,7–2,7 Gy, estaban en excelente acuerdo con las dosis obtenidas a partir de los dicéntricos. Se señaló en la sección 10.9.3 que las estimaciones de las dosis con FISH eran alrededor del 20 o 30 % superiores a las obtenidas con la producción de dicéntricos, lo que probablemente sea debido a que los recuentos de células sanguíneas en las personas afectadas están considerablemente disminuidos. La misma tendencia a subestimar la dosis en esa situación se aplicaría a la prueba de MN, puesto que también esta clase de daño tiene una persistencia *in vivo* limitada, especialmente a dosis altas.

12.5.3.3. *Emplazamiento de ensayos nucleares de Semipalatinsk*

El emplazamiento de ensayos nucleares de Semipalatinsk ha sufrido una elevada contaminación con precipitaciones radiactivas en el transcurso de 40 años de continuas pruebas de armamento (1949–1989). Las personas que vivían cerca del emplazamiento resultaron expuestas a radiaciones internas y externas. El análisis de dicéntricos y de MN se realizó en personas que vivían en diferentes pueblos contaminados y en un pueblo de control. Se encontró una incidencia más alta de dicéntricos y de micronúcleos en los residentes en las zonas contaminadas, que parece deberse principalmente a los radionucleidos incorporados internamente [298].

12.5.3.4. *Accidente con un dispositivo de radioterapia de contacto por rayos X de 50 kV*

En 2003 se aplicó la prueba CBMN a la evaluación retrospectiva de la dosis recibida por un trabajador de hospital que resultó expuesto accidentalmente durante el mantenimiento de un dispositivo de radioterapia de contacto por rayos X de 50 kV [299]. La dosis estimada fue de 0,73 Gy, con unos límites de confianza del 95 % de 0,54–0,96 Gy. El recuento de dicéntricos dio una dosis estimada de 0,62 Gy (margen de 0,45–0,90 Gy), que se correspondía muy bien con la dosis obtenida con la prueba de CBMN. Una lesión de la piel en la espalda del trabajador indicaba que la exposición había consistido en una irradiación parcial del cuerpo. A partir de la sobredispersión de los datos de dicéntricos se dedujo que había sido irradiada una fracción del 49 % del cuerpo. No fue posible aplicar ese tipo de análisis a los datos de MN, ya que los MN siempre muestran sobredispersión, incluso cuando ha sido irradiado el cuerpo entero. En una segunda muestra de sangre, extraída 1 año más tarde, se constató que la producción de dicéntricos había disminuido con el tiempo transcurrido desde la exposición. El semitiempo de desaparición fue de 342 días, muy próximo al valor de 377 días obtenido a partir de los dicéntricos. Este resultado concuerda con la disminución de la frecuencia de micronúcleos con el tiempo transcurrido desde la exposición, hasta el 60 % al cumplirse 1 año de tratamiento, observada en los pacientes de radioterapia [292].

12.5.3.5. *Accidentes de radiación a gran escala*

En el caso de los accidentes radiológicos a gran escala, cuando pueden haber quedado expuestos centenares de personas, es importante distinguir los individuos gravemente expuestos (≥ 1 Gy), que requieren tratamiento médico inmediato, de los que han resultado menos expuestos. A esos efectos se necesita una prueba rápida de dosimetría biológica. En un estudio reciente [87] se ha confirmado la eficacia del recuento automatizado de MN para el triaje rápido de la población en un contexto multicéntrico. En la sección 13.3.3 se proporciona información más pormenorizada.

13. AUTOMATIZACIÓN DE LAS PRUEBAS CROMOSÓMICAS

Para responder eficientemente a los sucesos radiológicos que provocan víctimas en gran escala es imperativo disponer de métodos citogenéticos automatizados de evaluación de la dosis que aumenten la velocidad del proceso, pues se trata de procedimientos lentos y laboriosos. Además, la automatización también mejora el control y la garantía de calidad. Asimismo, aumenta la seguridad del personal de laboratorio, ya que el protocolo prevé el manejo de sangre, que es un peligro biológico ocupacional. La automatización de las pruebas citogenéticas de laboratorio entraña lo siguiente: *i*) automatización de la preparación de las muestras, *ii*) automatización del análisis, y *iii*) uso de un sistema de gestión de la información de laboratorio para el seguimiento de las muestras y el manejo de los datos [300].

13.1. PROCESAMIENTO AUTOMATIZADO DE LAS MUESTRAS

El procesamiento automatizado de las muestras en un laboratorio citogenético requiere el uso de todo o parte del equipamiento siguiente: *i*) aparato de manejo robotizado de la sangre, *ii*) campana de bioseguridad, *iii*) incubadoras, *iv*) cosechadora de metafases, *v*) aparato de extensión de metafases, y *vi*) aparato de tinción de portaobjetos.

13.1.1. Aparato de manejo robotizado de la sangre

Un robot de manejo automatizado de líquidos adaptado al procesamiento ultrarrápido de muestras de sangre y al aislamiento de linfocitos a partir de sangre periférica entera puede eliminar un importante cuello de botella, que enlentece el procesamiento de las muestras en las evaluaciones citogenéticas de la dosis [300]. Los robots comerciales de manejo de líquidos, capaces de repartir, diluir y aspirar muestras de sangre, específicamente para las aplicaciones de los bancos de sangre [301], se pueden adaptar a la finalidad que se desee. Se trata de sistemas precisos, exactos y que no provocan ninguna contaminación cruzada de las muestras [302]. Los equipos robotizados de manejo de sangre se pueden dotar de una gran mesa de trabajo adaptada, un lector de códigos de barras para mantener la cadena de custodia de las muestras, brazos robotizados para el manejo de líquidos y el transporte de los tubos de vacío, tubos de centrifuga, y un dispositivo de lavado de puntas de pipetas. También se puede incorporar al robot un analizador de la viabilidad de las células, para corregir la densidad de los linfocitos en el momento de crear los cultivos, y una centrifuga automatizada de tubos basculantes, para realizar aislamientos por gradiente de densidad con el fin de crear cultivos de linfocitos aislados. Sin embargo, hay que encerrar la totalidad del equipo en un entorno preparado para nivel de bioseguridad 2, que garantice la esterilidad de las muestras y la salud ocupacional del personal de laboratorio. El sistema tiene que asegurar la integridad de la cadena de custodia [301].

13.1.2. Cosechadora de metafases

Para obtener de modo sistemático y fiable extensiones metafásicas de alta calidad se encuentran en el comercio cosechadoras de metafases adaptables que se pueden utilizar en la obtención de metafases a partir de cultivos de sangre. Esos dispositivos ahorran los aspectos laboriosos del proceso, pues realizan las tareas repetitivas de la obtención de metafases a partir de los cultivos: centrifugación y suspensión de las células, aspiración y disposición final del sobrenadante, tratamiento con solución hipotónica, y fijación de las células con ácido acético: metanol. Realizan el proceso en condiciones ambientales controladas, siguiendo un protocolo paso a paso sin intervención del usuario, con lo que aumenta la calidad y la reproducibilidad del proceso [300].

13.1.3. Aparato de extensión de metafases

La extensión de las metafases en los portaobjetos de vidrios está influida por la temperatura y la humedad [303]. Los sistemas automatizados proporcionan condiciones ambientales óptimas de temperatura y humedad durante la extensión de la suspensión celular

en los portaobjetos de vidrio, obteniéndose un volumen de producción superior al que se logra manualmente. El aparato tiene que disponer de un microprocesador que equilibre y controle con precisión la temperatura, la humedad y el tiempo de secado. Gracias a esos controles y a que su forma está adaptada a su función, los resultados obtenidos por distintos usuarios son coherentes entre sí, tanto para células humanas como animales. La guía para la pipeta sellable de que está dotado el aparato asegura la extensión sistemática de la muestra y contribuye a evitar que las muestras se entrecrucen.

13.1.4. Aparato de tinción automática de portaobjetos

El dispositivo ofrece un método rápido y sistemático de tinción de las preparaciones con Giemsa reduciendo al mínimo la intervención del operador. Los aparatos disponibles actualmente permiten programar de forma inteligente y flexible la tinción de entre 1 y 520 preparaciones, que se tiñen y aclaran sin supervisión aplicando a todas ellas un mismo protocolo, o protocolos distintos. Se pueden también asignar prioridades a las muestras, de modo tal que sin intervención del usuario se pueden poner en espera y procesar determinados lotes de muestras antes que otros. La batería de reserva con que cuenta el aparato asegura que el procesamiento de las muestras se mantenga autónomamente durante hasta 40 minutos en caso de que se interrumpa la corriente eléctrica.

13.2. ANÁLISIS AUTOMATIZADO DE LA IMAGEN

El análisis automatizado de las imágenes capturadas al microscopio no se aplica aún sistemáticamente en muchos laboratorios con fines de dosimetría biológica, aunque es probable que su uso aumente a medida que mejoren los sistemas. Ha habido intentos de automatizar el recuento en las cuatro pruebas descritas en esta publicación.

13.2.1. Identificación de metafases y captura de imágenes

Están aún en fase de desarrollo los equipos de análisis automatizado capaces de recontar las lesiones citogenéticas de forma totalmente autónoma y fiable, pero los identificadores ultrarrápidos de metafases, con equipos anexos de recuento, destinados al análisis manual asistido por ordenador pueden aumentar significativamente el volumen de producción de los operarios. Los identificadores de metafases facilitan la localización de las extensiones de metafases en las preparaciones y las presentan enfocadas y a gran aumento, listas para su análisis [304, 305].

Un sistema típico de identificación de metafases basado en el análisis de imágenes suele constar de una computadora, una cámara digital de alta resolución, un microscopio de gran calidad, una platina automatizada con autofocus, y un alimentador de preparaciones robotizado. La computadora dispone de programas de identificación automatizada de metafases y de recuento y anotación automática e interactiva para el análisis de aberraciones cromosómicas. Los identificadores de metafases pueden examinar hasta 150 preparaciones por ciclo de operación [300]. A medida que progresa el examen, los resultados (imágenes y ubicaciones de posibles extensiones) se van almacenando en el servidor central, y subsiguientemente se reubican automáticamente en múltiples estaciones de recuento automatizado donde se realiza el análisis cromosómico. Una opción alternativa consiste en codificar digitalmente las imágenes virtuales de alta resolución de las extensiones metafásicas captadas por los identificadores y transferirlas a través de una red privada virtual para su análisis y evaluación a distancia. Este tipo de “telerrecuento” requiere que se unifiquen los criterios, para que los resultados obtenidos sean comparables.

13.2.2. Automatización de la prueba de dicéntricos

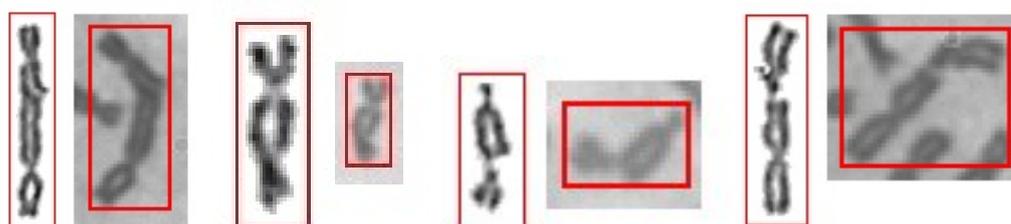
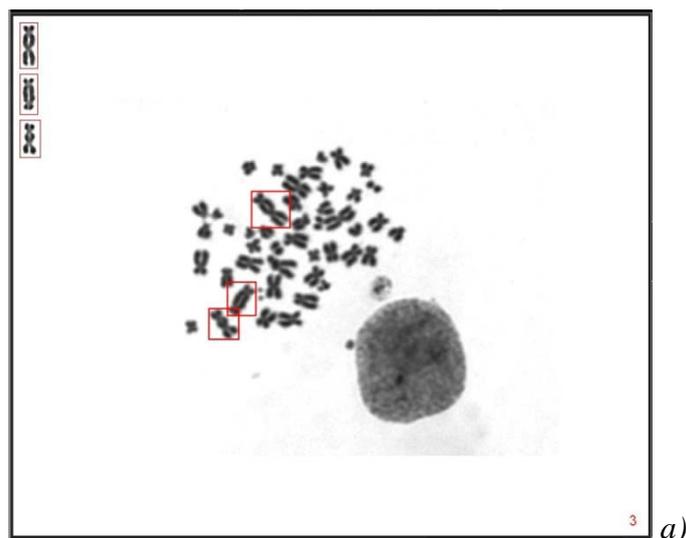
El análisis de cromosomas dicéntricos al microscopio es un procedimiento laborioso, que llevan a cabo en los laboratorios de dosimetría biológica técnicos bien entrenados y experimentados capaces de analizar varios centenares de células al día. A dosis bajas es

necesario analizar un gran número de metafases, razón por la cual la principal estrategia para mejorar el método consiste en automatizar el recuento de dicéntricos con el fin de ahorrar tiempo, en particular para evaluar la exposición a dosis bajas de radiación.

En los años 1980 se realizaron varios intentos de poner a punto sistemas automatizados de recuento [306–308]. Desde entonces han salido al mercado varios sistemas, y los correspondientes módulos informáticos de identificación de metafases y cariotipado se utilizan sistemáticamente en muchos laboratorios de citogenética. Este tipo de microscopía asistida por ordenador facilita el trabajo enormemente. En primer lugar se examina la preparación a bajo aumento, se detectan las metafases y se guardan sus coordenadas, todo ello en una operación sin supervisión. Durante el procedimiento se puede generar una colección de imágenes de las fases detectadas. A la vez que las células se van reubicando y analizando manualmente, se manejan cómodamente hojas de recuento electrónicas individuales, que se imprimen y archivan en forma de ficheros. En una respuesta rápida a una emergencia radiológica, las células aberrantes observadas se pueden fotografiar manualmente, digitalizándose y archivándose las imágenes inmediatamente. En conjunto, el uso de un identificador de metafases puede reducir a la mitad el tiempo de recuento [304].

Se es consciente desde hace tiempo que los procesos automatizados de detección de metafases, captación de imágenes y otros deberían ir seguidos del análisis electrónico de la imagen, para efectuar un análisis automatizado de los cromosomas, incluido el recuento de los dicéntricos. Se han dado varios pasos para llevar a cabo el recuento automático de los dicéntricos. En primer lugar, un identificador de metafases examina la preparación. En segundo lugar, las metafases detectadas se fotografían automáticamente y se digitalizan en imágenes de alta resolución. Seguidamente, las imágenes se segmentan, para identificar los cromosomas y los posibles dicéntricos. En los años 1990 solo se guardaban las imágenes de los posibles dicéntricos y sus coordenadas. En la actualidad, gracias a los progresos de la imagerie digital, el procedimiento es mucho más rápido y eficiente. Además, los adelantos registrados en la tecnología de los discos duros hace posible almacenar en alta resolución todas las células de una misma preparación.

La experiencia adquirida con los programas informáticos de recuento de dicéntricos muestra que es muy difícil elaborar algoritmos multietápicos jerarquizados que permitan segmentar una célula entera hasta obtener 46 cromosomas [308, 309]. En general, algunos cromosomas no se detectarán, ya sea porque se solapan o porque se encuentren muy próximos y aparezcan formando conglomerados cromosómicos. Por consiguiente, algunos dicéntricos escapan a la detección (falsos negativos). Asimismo, se pasarán por alto sistemáticamente algunos dicéntricos de tamaño menor al del cromosoma X, lo que puede ser el caso en menos del 8 %. Los presuntos dicéntricos detectados automáticamente tienen que ser validados por un operario capacitado, pero se trata de un proceso mucho más rápido y sencillo que el recuento manual. Los presuntos dicéntricos aparecen marcados en la pantalla (figura 44a) lo que facilita su evaluación rápida. La mayoría de los falsos positivos (por ejemplo, artefactos o cromosomas que se solapan, véase la figura 44b) se pueden descartar fácilmente.



b)

Fig. 44. a) Los presuntos dicéntricos detectados automáticamente aparecen marcados, con lo que la evaluación resulta más fácil y rápida. b) Los dicéntricos falsos positivos (es decir, cromosomas que se solapan, cromátidas retorcidas u objetos no segmentados), se pueden distinguir y descartar fácilmente.

Dado que el análisis de la célula es incompleto (el estándar manual es examinar únicamente las células completas, con 46 centrómeros) y la consiguiente incertidumbre, el recuento automatizado de dicéntricos aún no se ha impuesto como método sistemático. Además, se necesitan datos para decidir si la frecuencia de dicéntricos detectada se debe relacionar con el número de cromosomas detectados o si se puede contabilizar como dicéntricos por célula, teniendo presente que el número de cromosomas que se evalúa en cada célula no es una cifra constante. Lo cual plantea la cuestión del uso del índice de sobredispersión de dicéntricos (sección 9.7.4.3) y, por lo tanto, de las posibilidades de este método para detectar las irradiaciones parciales del cuerpo. Otro aspecto de interés puede ser la influencia de la calidad de las preparaciones. Las buenas extensiones de metafases aumentan el número de cromosomas detectados. Se precisan más investigaciones sobre el uso del dispositivo para optimizar el clasificador de dicéntricos adaptándolo a la calidad de las preparaciones de metafases del laboratorio.

La detección automatizada de dicéntricos proporciona resultados muy reproducibles. Las comparaciones de las curvas de dosis-efecto establecidas con recuentos manuales y semiautomatizados muestran una correlación muy buena entre los dos métodos. Según la información notificada, la eficiencia de la detección de dicéntricos con sistemas automatizados es de alrededor del 50–70 % [310, 311].

La automatización del recuento de dicéntricos ofrece la posibilidad de mejorar la prueba de dicéntricos y hacer de ella un instrumento útil para el cribado de un gran número de muestras de sangre en caso de emergencia radiológica en gran escala. Las estaciones de trabajo se podrían complementar con estaciones satélite en las que se evaluarían las células y

los dicéntricos, aumentando la capacidad y la producción del sistema. En el triaje, la automatización del recuento de dicéntricos disminuye significativamente el tiempo de análisis, y los resultados se correlacionan muy bien con el recuento manual [300, 310, 311].

13.2.3. Recuento automatizado de micronúcleos

Ya en los años 1990 se desarrollaron varios algoritmos de análisis automatizado de imágenes para la prueba CBMN [312, 313]. Sin embargo, los sistemas presentaban limitaciones tales como una inexactitud relativamente alta a la hora de clasificar las células BN. Más recientemente se han puesto a punto sistemas automatizados nuevos y mejores de análisis de imágenes para la prueba CBMN. El módulo de software para MN integrado en el sistema de búsqueda de metafases MSearch, desarrollado y comercializado por Metasystems (un fabricante de sistemas de imaginería microscópica) aplica criterios morfológicos para identificar automáticamente las células BN basándose en la presencia de dos núcleos adyacentes que presenten una tinción DAPI similar. En una segunda etapa, los MN se cuentan automáticamente en una zona circular definida alrededor de los dos núcleos de la célula BN [314, 315] (véase la serie de imágenes de células BN con MN, figura 45). No es necesario que un operario evalúe de nuevo la producción de MN detectada. Importa señalar que, al contrario que en los criterios aplicados en el recuento visual en la prueba CBMN, el programa de Metasystems no utiliza el límite citoplasmático para identificar las células binucleadas sino que meramente da por supuesto que la proximidad estrecha de dos núcleos (que cumplan determinados parámetros de las pautas de reconocimiento del programa de clasificación) basta para identificar con exactitud las células binucleadas; de ser preciso, para comprobar la exactitud de la detección de las células binucleadas se puede visualizar el límite citoplasmático mediante microscopia de contraste de fases, como recomiendan Eastmond y Tucker (1989) [284].

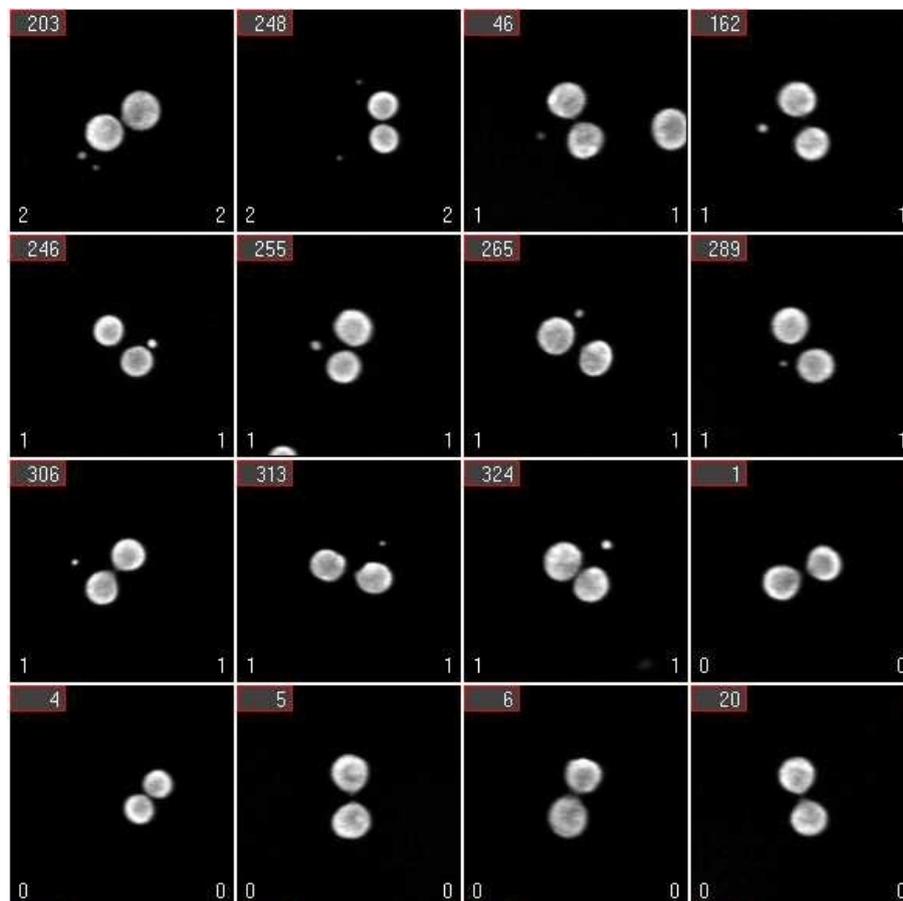


Fig. 45. Serie de imágenes de células BN con y sin MN captadas con un sistema automatizado.

En un sistema desarrollado por Decordier *et al.* [316] para la biomonitorización de la exposición *in vivo* a agentes mutágenos se utiliza una estación de captura y dos estaciones de trabajo de análisis de MN. En primer lugar, el sistema identifica el citoplasma de las células, teñidas con Giemsa, seguidamente detecta el número de núcleos de la célula, lo que posibilita la identificación de las células BN, y en una tercera etapa se recuentan los MN.

En un estudio realizado por Willems *et al.* [87] se demostró que el recuento automatizado de MN era adecuado y ventajoso para el triaje de la población en el caso de las emergencias radiológicas en gran escala, cuando es importante distinguir los individuos gravemente expuestos (≥ 1 Gy), que requieren un seguimiento y tratamiento médico precoz, de los que han resultado menos expuestos.

Los recuentos de MN totalmente automatizados obtenidos en el último estudio mostraban un alta correlación con los recuentos manuales de MN ($r^2 = 0,917$) prueba de que no era necesaria la validación visual [87]. La curva de dosis-respuesta de referencia obtenida para el recuento automatizado de MN, sobre la base de los datos de MN de 10 personas, mostró que la incertidumbre de la determinación de la dosis de 1 Gy se eleva a 0,2 Gy. Los intervalos de confianza del 95 % de las dosis de 0 Gy y 1 Gy no se solapaban. También se lograron estimaciones exactas de la dosis para dosis más elevadas, de 2 y 3 Gy. Por consiguiente, el sistema de recuento de MN es capaz de distinguir las exposiciones a dosis de 1, 2 o 3 Gy. En este estudio se calculó que 2 operarios pueden procesar al menos 60 muestras de sangre (120 preparaciones) en un turno de 12 horas.

En general, el número de muestras de sangre analizadas se puede aumentar de modo importante utilizando más unidades de trabajo automatizadas. Aquí, una red de laboratorios capacitados dotados de un equipamiento similar y clasificadores de MN, que apliquen protocolos estandarizados de fijación, pueden obtener resultados comparables. De este modo, se puede aumentar el volumen de producción del recuento automatizado de MN para responder con rapidez a una emergencia radiológica en gran escala.

13.2.4. Prueba de condensación prematura de los cromosomas

En esencia, el planteamiento es similar al del análisis de dicéntricos, utilizando la identificación automatizada de metafases en preparaciones teñidas con Giemsa [75]. Seguidamente, las imágenes pasan al operador, que efectúa el recuento a vista. La velocidad del análisis es aproximadamente tres veces superior a la del análisis enteramente manual.

13.2.5. Prueba de traslocaciones con FISH

Se han obtenido resultados bastante buenos utilizando la tinción FISH de 3 o 4 parejas de cromosomas [75]. Se ha puesto a punto un sistema integrado por un PC y una cámara CCD refrigerada [75] en el que se aplicaba un planteamiento en dos fases: identificación de las metafases mediante contratinción de fluorescencia, seguida de detección de las traslocaciones en que participan cromosomas marcados con pintura del cromosoma entero. A partir de la lista de presuntas traslocaciones se han medido tasas similares de falsos positivos y falsos negativos en preparaciones de linfocitos teñidas con fluorescencia (alrededor del 10 %), como se ha notificado para el caso de los presuntos dicéntricos en preparaciones teñidas con Giemsa [317]. Para la fluorescencia se requería un tiempo de cribado más prolongado: 1 hora por preparación, 25 min de la cual se destinaban al autoenfoco, en comparación con los pocos minutos por preparación necesarios en microscopía de campo claro. En consecuencia, en la cámara CCD se utiliza un chip de mayor tamaño, para aumentar la velocidad de recuento. Para la detección de cromosomas pintados parece bastar un umbral relativamente sencillo, basado en el histograma del nivel de gris combinado con algunas operaciones morfológicas; se detectan cromosomas o partes de cromosomas marcados con la sonda de pintado para el cromosoma entero [318]. En un estudio de detección de traslocaciones inducidas por rayos X que afectaban al

cromosoma N° 4 se puso a prueba la idoneidad del sistema para recontar traslocaciones. En una comparación entre el recuento automatizado y el manual se constató que la eficiencia de la prueba automatizada era aproximadamente del 90 % de la obtenida manualmente.

Se puede mejorar la sensibilidad del método si se aumenta el número de cromosomas hibridados utilizando un color adicional. Sin embargo, cuando se aumenta el número de cromosomas pintados es esencial disponer de procedimientos para separar los cromosomas que puedan tocarse o solaparse [319]. Piper *et al.* [320] notificaron la construcción de un identificador de metafases de fluorescencia a partir de un equipo comercial y una estación de trabajo Unix convencional. Se utilizó un combinado de los cromosomas N^{os} 1, 2 y 4 y se realizó una comparación con el recuento manual. Los resultados mostraron que el tiempo necesario para el análisis se dividía por tres. Además, el identificador de metafases encontró más preparaciones susceptibles de recuento que el examen visual. El recuento asistido por máquina presentaba otras ventajas, en particular, que la digitalización de las imágenes de metafases a veces podía ser útil en el análisis de las reordenaciones cromosómicas, porque permitía examinar de nuevo las células y realizar un análisis más profundo. El sistema se puede modificar también aplicando un árbol de decisión binario para la clasificación de las metafases observadas y para mejorar la exactitud del examen [321]. Otra ventaja que ofrece la conservación informatizada de imágenes digitalizadas en color es que se pueden mejorar electrónicamente, lo que a veces permite distinguir mejor que a vista la traslocación de porciones cromosómicas muy pequeñas.

Una ampliación obvia en la que se está trabajando es el análisis de preparaciones FISH multicromáticas combinando genotecas de ADN específicas para cromosomas y centrómeros, con el fin de analizar simultáneamente las traslocaciones y los dicéntricos.

13.3. SISTEMA DE GESTIÓN DE LA INFORMACIÓN DE LABORATORIO (LIMS)

Un programa LIMS comercial adaptable puede ser un instrumento indispensable para afrontar los problemas derivados del aumento del volumen de preparación y análisis de muestras. Además, un LIMS puede facilitar el manejo de los ficheros generales del laboratorio en lo relativo a la capacitación del personal, la calibración de los instrumentos, el inventario de productos químicos, etc. El manejo de los datos electrónicos con un LIMS permite, entre otras cosas, vincular, buscar y recuperar los datos y notificar rápidamente los resultados en caso de catástrofe radiológica. Existen varios módulos, que se describen brevemente a continuación:

- **Identificación de las muestras** — Las muestras reciben un código de barras exclusivo.
- **Transporte de las muestras** — Plantillas estructuradas para el ingreso de datos relativos al estado de las muestras durante el transporte y a la llegada (por ejemplo, valores de la temperatura registrados).
- **Organización de las pruebas** — Asignación del procesamiento y las pruebas citogenéticas adecuadas para cada muestra (por ejemplo, cultivo de sangre entera o aislamiento de linfocitos; prueba de dicéntricos o CBMN).
- **Programación de las muestras** — Determinación de prioridades en el análisis de las muestras en función de la urgencia del caso y asignación de los casos al personal del laboratorio.
- **Seguridad** — Exigencia de que los usuarios se autentiquen mediante contraseñas. Dentro del subsistema se pueden otorgar atribuciones distintas a los usuarios.
- **Auditoría** — Seguimiento de los registros y las modificaciones.

- **Archivo** — Mantiene la operación eficiente de la base de datos, facilitando la preservación de la integridad de los registros y asegurando la salvaguardia segura de los datos científicos.
- **Presentación de informes** — Obtención de informes formateados de casos individuales, que se pueden comunicar al médico responsable.
- **Integración de instrumentos** — Los datos se pueden recabar y agregar directamente a partir de los distintos módulos, lo que disminuye el riesgo de que se produzcan errores de transcripción. De ese modo se mejora la exactitud y coherencia de los datos, lo que tiene importancia decisiva en las respuestas a los sucesos que provocan víctimas en gran escala.

En la figura 46 se ofrece una representación esquemática de un laboratorio citogenético automatizado ampliable y de gran volumen de producción [301, 302].

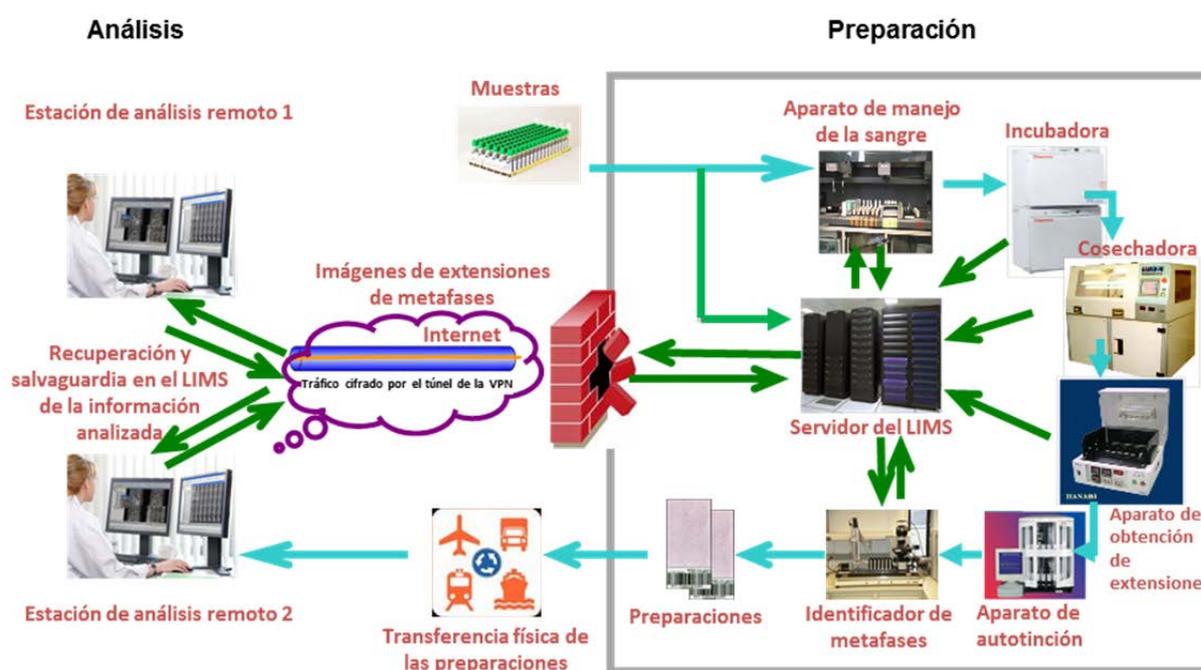


Fig. 46. Representación esquemática de un laboratorio citogenético de gran volumen de producción y automatización con una red de LIMS. Las preparaciones obtenidas en el laboratorio central se pueden transferir físicamente a los laboratorios o estaciones de recuento, o se pueden transmitir sus imágenes de forma electrónica y segura a los laboratorios de destino, donde se analizan (cortesía de Ramakuma y Prasanna, AFRRI, EE.UU.).

14. SUCESOS QUE PROVOCAN VÍCTIMAS EN GRAN ESCALA

Se define el suceso que provoca víctimas en gran escala como aquel en el que resultan lesionados un número suficientemente grande de personas para que la capacidad de respuesta local quede superada [322, 323]. Cuando en ese tipo de sucesos interviene la radiación, puede que una población numerosa haya recibido dosis de radiación que van desde los niveles de la radiación de fondo hasta niveles suficientemente grandes para tener consecuencias médicas. Es necesario evaluar rápidamente los niveles de exposición de esas personas para determinar si se precisa intervención médica [4, 322, 324–326].

Los sucesos en los que interviene la radiación pueden ser consecuencia de accidentes o actos dolosos y, en ambos casos, si llegan a producirse pueden provocar víctimas entre la población general. Pueden coincidir también factores de confusión tales como las lesiones físicas convencionales, y hay que ocuparse de las lesiones que amenazan la vida antes que de las actividades de dosimetría u otras [327].

La planificación y la preparación son decisivas para que la respuesta a un suceso que provoca víctimas en gran escala sea eficaz. En el caso de una emergencia radiológica, las directrices genéricas aceptadas prevén lo siguiente: a) establecimiento y capacitación de equipos de respuesta local y nacional dotados de equipamientos y suministros críticos, b) conocimiento y aplicación de un planteamiento apropiado y disponible de evaluación de las lesiones radiológicas y la dosis de radiación, y c) acceso a laboratorios de referencia de apoyo, incluidos laboratorios de expertos para la evaluación de la dosis mediante biodosimetría citogenética [322, 328, 329]. Un elemento crítico del “concepto de las operaciones” en dosimetría biológica es priorizar la selección de muestras que se someterán a triaje citogenético y evaluación de la dosis, lo que requiere una comunicación dinámica entre el personal médico de intervención y el del laboratorio de referencia en materia de biodosimetría citogenética.

14.1. POSIBLES ESCENARIOS DE EXPOSICIÓN RADIOLÓGICA

14.1.1. Sucesos dolosos

Se han determinado cierto número de posibles escenarios de exposición dolosa a la radiación, que se enumeran aquí en tres categorías generales [322, 324, 326].

- a) Dispositivos de exposición radiactiva (DER); se trata de fuentes selladas distribuidas en un entorno pero que no representan una amenaza de contaminación. Las personas que se aproximan a esas fuentes pueden recibir dosis localizadas importantes, pero es de prever que la cifra de individuos muy expuestos sea pequeña.
- b) Dispositivos de dispersión radiactiva (DDR); utilizan elementos explosivos o mecánicos para distribuir el material radiológico que provoca la contaminación radiactiva. Se vería afectada una zona relativamente pequeña y las exposiciones a la radiación podrían darse en forma de contaminación tanto externa como interna, si bien es de prever que las exposiciones no lleguen al grado de tener importancia médica.
- c) Dispositivos nucleares improvisados (DNI); contienen material nuclear capaz de producir explosiones nucleares. Pueden causar radiaciones y lesiones térmicas de gran extensión, con grandes cifras de muertos y víctimas afectados por altas dosis de radiación. El resultado de un tal suceso sería catastrófico.

14.1.2. Sucesos accidentales

Las exposiciones a la radiación pueden ser consecuencia de varios escenarios, entre otros los siguientes [326]:

- a) Emergencias en reactores con fuga de elementos de combustible irradiado durante una pérdida de refrigerante. Estas emergencias pueden dar lugar a que los trabajadores y el público en general situado cerca del emplazamiento reciban altas dosis y que se libere contaminación que impartirá dosis bajas al público en general (como, por ejemplo, en Chernóbil).
- b) Se pueden producir accidentes de criticidad cuando inadvertidamente se permite que entren en fisión cantidades suficientes de material nuclear especial. En ese caso, las personas que se encuentran muy cerca sufrirán altos niveles de exposición (como, por ejemplo, en Tokai-mura).
- c) Las emergencias en que intervienen fuentes “huérfanas” perdidas o robadas pueden dar lugar a varios escenarios de exposición, dependiendo de la actividad, la duración de la exposición y la distribución de la fuente. Estas emergencias pueden provocar exposiciones del cuerpo entero o parciales, así como contaminación interna o externa (como, por ejemplo, en Goiânia).

14.2. EXPERIENCIA HISTÓRICA

Se han dado varios ejemplos en el pasado reciente en que se ha utilizado la biodosimetría citogenética para evaluar las exposiciones a la radiación después de sucesos accidentales que han provocado un gran número de víctimas (cuadro 17).

CUADRO 17. SELECCIÓN DE EJEMPLOS DE USO DE LA BIODOSIMETRÍA CITOGÉNÉTICA EN ACCIDENTES DE RADIACIÓN CON MÚLTIPLES VÍCTIMAS

Año del accidente	Lugar del accidente	Número de personas afectadas	Casos sometidos a pruebas citogenéticas				Referencias
			Dicéntricos	PCC	FISH	CBMN	
		>100 000	436				[342, 343, 344]
1986	Chernóbil (Ucrania)		1 755		97		[235, 236, 347]
						140 ^a	[259, 260, 297]
1986–1987	Lilo (Georgia)	11	11		4		[247] [248]
1987	Goiânia (Brasil)	250	129				[350]
1995	Estambul (Turquía)	21	21	10	5	10	[349] [158]
1998	Matkhoji (Georgia)	múltiples	85				[333]
1999	Tokai-mura (Japón)	43	43		3		[351] [253] [254]
2 000	Bangkok (Tailandia)	múltiples	28	28			[352]
2005	Concepción (Chile)	233	45		1		[353]
2006	Dakar (Senegal)	63	33				[354]

^a Retrospectivo

Los accidentes pueden presentar características muy diferentes; puede tratarse de sucesos súbitos, reconocidos inmediatamente, con gran número de víctimas identificadas en un período breve (por ejemplo, Chernóbil), o situaciones que evolucionan más lentamente, en las que se tarda en descubrir a los individuos expuestos (por ejemplo, Goiânia). En un accidente se pueden dar solo unos pocos casos reales, pero con una fortísima presión del público para que se amplíe la dosimetría biológica a la comunidad limítrofe incluso aunque haya pocas pruebas físicas, o ninguna, que justifiquen esa medida (por ejemplo, Tokai-mura). En este caso, el laboratorio de biodosimetría citogenética del Instituto Nacional de Ciencias Radiológicas (NIRS) pudo determinar las dosis de las 265 personas en cuestión mediante reconocimientos realizados en los lugares donde se encontraban durante el suceso y asegurarles que no se habían recibido dosis significativas [330]. En una cohorte de 43 personas de una instalación de procesamiento de uranio, para las que se confirmó una ligera exposición midiendo el recuento de ^{24}Na en el cuerpo entero, se evaluó asimismo la dosis mediante análisis de las aberraciones cromosómicas.

Tradicionalmente, después de las exposiciones accidentales que afectan a múltiples víctimas, para estimar la dosis se utiliza la biodosimetría citogenética con análisis de dicéntricos, junto con el recuento sistemático de los leucocitos (véase el cuadro 17). Se han utilizado otras pruebas citogenéticas (FISH, PCC y CBMN) para confirmar las estimaciones de la dosis, si bien a menudo se llevan a cabo meses o años después del accidente.

14.3. FUNCIÓN DE LA DOSIMETRÍA BIOLÓGICA

14.3.1. Métodos de evaluación de la exposición a la radiación

Después de un suceso radiológico con víctimas a gran escala, lo que más preocupa a los médicos es salvar vidas y evaluar los signos y síntomas médicos para adoptar decisiones sobre los primeros tratamientos. Varias evaluaciones de la exposición a la radiación, consensuadas por un grupo internacional de expertos, se pueden aplicar a la fase temprana de la radiación aguda [6, 25, 322, 325–327, 329]. En una emergencia radiológica con víctimas en gran escala habrá que aplicar los métodos de evaluación de la radiación apropiados, en función del escenario de radiación y de los recursos disponibles.

14.3.2. Concepto de las operaciones en dosimetría biológica

Las directrices genéricas sobre el “concepto de las operaciones” para los primeros actuantes en sucesos radiológicos con víctimas en gran escala se describen muy bien en recursos del OIEA [322, 323] y en el sitio web del Departamento de Salud de los Estados Unidos [331]. Sin embargo, la aplicación de un planteamiento de evaluación por dosimetría biológica multiparamétrica en una emergencia radiológica con víctimas en gran escala puede ser un factor de confusión importante si se carece de acceso a equipos de expertos [322, 323]. En la figura 47 se ilustran los componentes del REAC/TS y la estrategia de tratamiento AFRRI, junto con el concepto de las operaciones de uso en dosimetría biológica multiparamétrica [329].

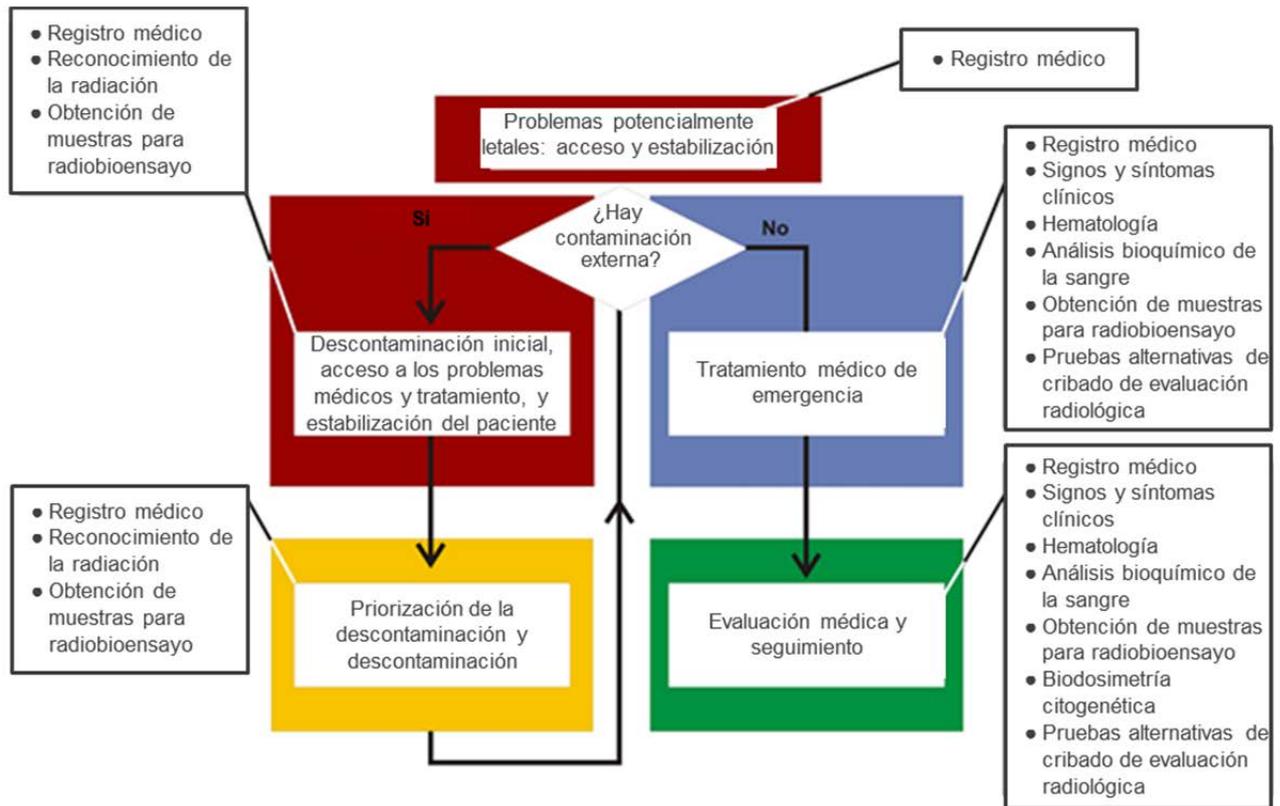


Fig. 47. Concepto de las operaciones de dosimetría biológica durante el manejo de una emergencia radiológica con traumatismos o enfermedad. Se muestran las funciones de dosimetría biológica de cada uno de los pasos de acción del algoritmo “Tratamiento del paciente radiológico” de REAC/TS y AFRI [329].

Los métodos actuales de evaluación de la exposición a la radiación, y las tecnologías emergentes, tienen posibilidades de contribuir a la respuesta a las lesiones radiológicas y la evaluación de la dosis. Se necesitan actividades de investigación y desarrollo para establecer un concepto de triaje de diagnóstico que facilite un concepto de las operaciones funcional en materia de dosimetría biológica en las emergencias radiológicas con víctimas en gran escala [329]. La primera prueba de cribado radiológico debe ser rápida (1 por minuto o menos), debe realizarse con un dispositivo de mano y, preferiblemente, mediante una prueba que realice el propio personal. Las pruebas radiológicas secundarias y terciaria pueden precisar más competencia técnica y ser más largas (>1 días) pero tener una especificidad radiológica superior.

Una vez identificados como potencialmente expuestos, se puede recomendar que los pacientes sean sometidos a dosimetría biológica para confirmar la presunta exposición y determinar el nivel de la dosis. En la fase de respuesta temprana a una emergencia radiológica, la finalidad inicial del triaje citogenético es realizar una estimación rápida de la dosis para cada uno de los pacientes derivados en complemento de esta primera evaluación clínica. Aunque estas primeras estimaciones de la dosis no sean particularmente exactas, el objetivo es clasificar rápidamente a los pacientes en uno de los cuatro márgenes de dosis (de 1 Gy a 2 Gy, de 2 Gy a 4 Gy, de 4 Gy a 6 Gy y > 6 Gy) para proporcionar a la comunidad médica información puntual que se pueda utilizar en el tratamiento de los pacientes [4]. En esta fase también se pueden descartar muestras falsamente positivas por presentar síntomas, por ejemplo, vómitos debidos a otras causas, y se pueden identificar las exposiciones parciales del cuerpo.

Una vez superada la urgencia inicial de realizar dosimetrías rápidas de triaje, los pacientes en los que se ha constatado que han recibido dosis importantes se pueden analizar de nuevo para obtener estimaciones más exactas de la dosis.

Cuando la emergencia ha pasado y se han efectuado dosimetrías en los individuos identificados como expuestos, el seguimiento continúa en los que han recibido dosis muy bajas o nulas pero necesitan que se los tranquilice. Asimismo, se necesitarán estudios epidemiológicos de seguimiento con otras técnicas, por ejemplo FISH.

14.3.3. Comunicación con la comunidad médica

La comunicación entre la comunidad médica y los laboratorios de dosimetría biológica es esencial. A ese respecto hay que tener debidamente en cuenta la confidencialidad médica [3, 4]. Toda información de la comunidad médica que ayude a los técnicos que realizan las biodosimetrías a determinar las prioridades de las muestras es extremadamente útil. Igualmente esencial es la información que el laboratorio de dosimetría biológica transmita oportunamente de vuelta a la comunidad médica y facilite la adopción de decisiones sobre el tratamiento de los pacientes. Este requisito de comunicación continua pone de relieve la importancia de que durante la respuesta al evento el seguimiento de las muestras sea robusto. Es fundamental disponer de un sistema único de codificación de las muestras, bien establecido y documentado (por ejemplo, el LIMS descrito en la sección 13.3) de tal modo que las muestras se puedan seguir desde su obtención y a través del procesamiento y análisis, hasta la notificación de vuelta a la comunidad médica. Los laboratorios de citogenética trabajan con muestras enmascaradas, mientras que los profesionales de la medicina trabajan con nombres. El laboratorio necesita identificar a las personas que accederán a la información del LIMS o documentos similares para comunicarse con los profesionales médicos. Esas personas tendrán que romper la codificación para poderse comunicar con los médicos, por lo que probablemente no deberían participar en el examen de las muestras.

14.4. ESTRATEGIAS ACTUALES CUANDO HAY VÍCTIMAS EN GRAN ESCALA

14.4.1. Recuento de triaje

Se puede aplicar el recuento rápido de triaje en varias de las pruebas citogenéticas utilizadas en dosimetría biológica. Se ha determinado que si en la prueba de dicéntricos se examinan 50 células (o se recuentan 30 dicéntricos), las estimaciones de la dosis se pueden realizar con una exactitud suficiente para obtener estimaciones de la dosis de utilidad para la comunidad médica. Se ha comprobado que este método de recuento puede ofrecer estimaciones de la dosis con un margen de 1 Gy [332, 333]. Comparado con el recuento completo de la prueba de dicéntricos, de 500 a 1 000 células, este método de triaje multiplica por 20 el volumen de producción. Para aumentar aún más la velocidad de recuento, Flegal *et al.* han puesto a punto el método QuickScan, en el que se recuenta el daño de las células, sin tener en cuenta el requisito de que posean 46 centrómeros, aunque solo se examinan las células que aparentemente están íntegras. Con este método de recuento, el tiempo de examen al microscopio disminuye en un factor adicional de 6 [334].

En los casos con víctimas a gran escala, la PCC es particularmente útil para las exposiciones a dosis altas. Se ha comprobado la utilidad del método de los anillos PCC en la dosimetría de triaje para dosis superiores a 6 Gy, midiendo 300 células PCC o 50 anillos [335]. Sin embargo, la prueba tiene limitaciones para el margen de dosis bajas.

El recuento de triaje también se puede aplicar a la prueba CBMN. Para dosimetría biológica convencional se recomienda examinar 1 000 células binucleadas. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que el examen de 200 células BN permite identificar dosis superiores a 1 Gy [335]. El tiempo necesario para examinar 200 células BN es de unos 15 min, significativamente más breve que el recuento de triaje con dicéntricos y aún ligeramente más rápido que el QuickScan. Otra ventaja de este método es que precisa mucha menos competencia técnica y formación para el recuento que la prueba de dicéntricos, con lo que se podría formar rápidamente personal para el recuento en una situación con víctimas en gran escala.

14.4.2. Automatización

La automatización se ha examinado en detalle en la sección 13. No cabe duda de que la automatización aumentará el volumen de producción y liberará recursos humanos para otras tareas necesarias durante los sucesos con víctimas en gran escala. La automatización puede comprender el procesamiento de la sangre, la cosecha de metafases, la identificación de metafases y el recuento de dicéntricos o micronúcleos.

14.4.3. Redes

Muchos países han establecido laboratorios de referencia especializados en biodosimetría citogenética. Recientemente, algunos de esos laboratorios han establecido redes nacionales y regionales para reforzar sus capacidades [118, 337, 338]. Otros han examinado sus recursos y capacidades nacionales con miras a crear una red regional [339]. Algunos organismos y organizaciones (OIEA, OMS) de las Naciones Unidas que cooperan a escala internacional también han establecido redes citogenéticas [340, 341] (cuadro 18). Pocos países cuentan con más de un laboratorio de citogenética cuya función principal sea realizar dosimetrías biológicas. Sin embargo, puede que en otros institutos de investigación, y en particular en los departamentos de genética clínica de los hospitales, se disponga de mucha competencia técnica en citogenética. En algunas redes nacionales (por ejemplo, en Francia, Corea, Japón, Canadá) se han establecido acuerdos, con inclusión de la formación, en cuya virtud esa competencia técnica se podría movilizar rápidamente bajo la dirección del laboratorio de referencia especializado en dosimetría biológica. El establecimiento de redes, ya sean nacionales o internacionales, exige que se coordine la infraestructura de la logística, el manejo de los datos y las comunicaciones. Esas redes también ofrecen una excelente plataforma para realizar ejercicios y estudios comparativos que aseguren un desempeño adecuado de los distintos laboratorios y las redes de biodosimetría citogenética. El uso de redes de citogenética refuerza las capacidades para utilizar la evaluación de la dosis a efectos de triaje y derivación mediante análisis citogenéticos en los sucesos radiológicos con víctimas en gran escala.

CUADRO 18. RESUMEN DE LAS REDES DE DOSIMETRÍA BIOLÓGICA EXISTENTES

Ubicación	Nombre	Dirección	Participantes (número o nombre)	² Pruebas utilizadas
Internacional	Mundial	OIEA	Variable ⁴	DCA, FISH, PCC, CBMN
	Red de asistencia en relación con las respuestas (RANET)			
Mundial	BioDoseNet	OMS	63	DCA, FISH, PCC, CBMN
Europa	Tripartita	depende de la ubicación del suceso	³ Alemania, Francia, Reino Unido	DCA, FISH, PCC, CBMN
América Latina	Red latinoamericana de dosimetría biológica	¹ Argentina — Autoridad Regulatoria Nuclear y Cuba — Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones	Argentina (2), Brasil, Chile, Cuba, México, Perú, Uruguay	² DCA, FISH, CBMN
Nacional	Canadá	Health Canada	4 de referencia 18 satélites	DCA, FISH, CBMN
	Cytogetic Emergency Network			
Francia	Réseau de dosimétrie biologique	Instituto de Radioprotección y Seguridad Nuclear (IRSN)	2 laboratorios del CEA y uno del MNHN	DCA, FISH, PCC
Japón	The Chromosome Network	Instituto Nacional de Ciencias Radiológicas (NIRS)	7	DCA, PCC, FISH
Corea del Sur	Korean Radiation Biodosimetry Network	Instituto de Ciencias Médicas y Radiológicas de Corea	6	DCA, FISH, PCC, CBMN

¹ La dirección cambia por rotación cada dos años entre los países participantes.

² DCA es la técnica aplicada con fines de cooperación mutua; al menos algunos de los asociados en la red disponen de PCC, FISH y CBMN.

³ Codirectores.

⁴ Parte de una red más amplia de asistencia y respuesta.

15. PROGRAMAS DE CALIDAD Y NORMAS ISO

15.1. JUSTIFICACIÓN DE UN PROGRAMA DE GARANTÍA Y CONTROL DE LA CALIDAD

En la presente publicación se ha mostrado que no existen procedimientos adoptados universalmente para las pruebas citogenéticas utilizadas en dosimetría biológica. En términos generales, los laboratorios aplican métodos similares, pero se considera que algunas variaciones de detalle que se dan en los métodos podrían influir en la calidad de los resultados. Por consiguiente, es razonable prever que todos los laboratorios de servicios pongan a punto programas de garantía de la calidad que aseguren la robustez, exactitud y reproducibilidad de sus procedimientos.

Para garantizar la calidad del producto de un laboratorio de dosimetría biológica a la largo de un período de tiempo prolongado, su proceso de producción tiene que asentarse sólidamente en principios científicos, la validación del método y la verificación del producto. Un programa de calidad completo proporciona una estrategia de salvaguardia de la calidad del producto del laboratorio, ya se trate de una medición o de un servicio. Además, esas capacidades precisan que periódicamente se realicen comparaciones con las de otros laboratorios de biodosimetría citogenética certificados o adecuadamente calificados, y requieren la estabilidad de los procesos del laboratorio y una evaluación periódica del producto final para confirmar que cumple con las especificaciones predefinidas.

Un funcionamiento que se atenga a las orientaciones de criterios documentados y a un programa interno de garantía de la calidad, con evaluaciones por homólogos y procedimientos de calidad documentados, asegura la explotación estable entre evaluaciones formales de la competencia.

El programa interno de garantía de la calidad tiene que abarcar las evaluaciones programáticas, un entorno operacional adecuado, las cualificaciones del personal, los manuales de operaciones, los instrumentos, la calibración, la categorización los datos, el sistema de registro y la notificación de los datos. El control del proceso citogenético entre evaluaciones de la competencia supone otra garantía de que los productos finales son de calidad reproducible. La adopción de un planteamiento integral de la gestión de la calidad aseguraría la mejora ininterrumpida de las operaciones.

Con las pruebas de competencia se evalúa periódicamente la coherencia de las mediciones respecto de otros laboratorios de biodosimetría citogenética certificados o de idoneidad cualificada (véase el anexo VII) y se ponen a prueba el laboratorio y su capacidad de proporcionar productos y/o servicios, es decir, estimaciones de dosis, de alta calidad. Un elemento fundamental es la superación con éxito de unas pruebas dentro de unos límites de exactitud especificados. Además, este proceso de medición se puede utilizar para verificar la calidad de la producción de servicios/productos del laboratorio. En lo que se refiere específicamente a la dosimetría biológica se pueden aplicar dos estrategias de medición de la competencia: 1) se exponen muestras *in vitro* a una radiación con una dosis, tasa de dosis y calidad de la radiación conocidas, y se mandan al laboratorio de servicios para su análisis, y 2) el laboratorio participa en un estudio interlaboratorios de comparación de muestras enviadas a analizar a laboratorios certificados o de idoneidad cualificada. En ambos casos, los análisis y las comparaciones se realizan entre el valor obtenido por el laboratorio y el obtenido por su laboratorio de prueba. Seguidamente se notifica al laboratorio en un informe el porcentaje de diferencia. En la prueba directa solo se examina la capacidad del laboratorio para realizar mediciones. Por el contrario, cuando el laboratorio analiza un producto propio y manda también una porción al laboratorio de prueba para que se realicen mediciones de confirmación y de trazabilidad explícita, se examinan tanto los procesos analíticos del laboratorio como su capacidad de medición.

Combinando todas estas estrategias de garantía de calidad se puede garantizar la calidad e integridad de las mediciones o los servicios del laboratorio. De esas estrategias, habría que hacer hincapié principalmente en que se disponga de programas internos robustos de garantía de calidad, se lleven a cabo evaluaciones activas y minuciosas *in situ* a cargo de expertos, se respeten estrictamente los criterios operacionales documentados, y se realicen evaluaciones mediante pruebas “enmascaradas”. Esta combinación de comprobaciones asegurará que los procesos analíticos se mantengan controlados dentro de los objetivos de precisión especificados. Aunque es preceptivo realizar evaluaciones periódicas del producto final (por ejemplo, cada 1 a 3 años), su frecuencia puede ser mínima cuando los procesos analíticos se mantienen bajo control.

Los planes de garantía de calidad para los laboratorios de servicios que realizan dosimetrías biológicas deberían constar de los elementos siguientes:

- identificación y preparación de las muestras
- validación de los procedimientos o métodos
- mediciones
- categorización de los datos
- documentación

El plan de garantía de calidad debe prever medidas sistemáticas para ofrecer la confianza adecuada de que las mediciones o procedimientos se realizarán de modo satisfactorio.

La Organización Internacional de Normalización (ISO) pareció la entidad adecuada para redactar y establecer un conjunto común de reglas. Los principios generales en que se asienta la elaboración de las normas en la ISO son la voluntariedad, el consenso y su aplicación en el conjunto del sector industrial. Además, todos los proyectos de normas se someten al examen de homólogos, en grupos de trabajo de especialistas, y seguidamente de los países participantes por conducto de los representantes nacionales en la ISO. Después de su publicación, las normas se pueden utilizar directamente o se incorporan a las normas nacionales. En 1998 se propuso la creación de un grupo de trabajo sobre la normalización de la dosimetría biológica, que fue aceptado en 1999, dentro del Comité Técnico 85, Energía nuclear, en el nivel del Subcomité 2, Protección radiológica. El grupo de trabajo está integrado por 13 especialistas de 11 países, además de un representante del OIEA. La norma ISO 19238, publicada en 2004, establece los criterios estándar para los laboratorios que realizan dosimetrías biológicas mediante citogenética [3].

15.2. ESTRUCTURA ACTUAL DEL DOCUMENTO ISO 19238 [3]

En su formato actual, el documento está dividido en 11 capítulos y 4 anexos de información.

Los aspectos principales descritos en el documento se refieren a lo siguiente:

- a) Confidencialidad de la información personal en lo siguiente:
 - i) Transmisión de datos confidenciales relativos al paciente o a las circunstancias de la sobreexposición, desde el médico que representa al paciente (o el propio paciente) al laboratorio.
 - ii) Anonimato de la muestra de sangre y confidencialidad de los resultados y del informe.
 - iii) Delegación de la confidencialidad dentro del laboratorio.
- b) Posibles riesgos a que se expone el personal del laboratorio durante el procesamiento de una muestra de sangre potencialmente infecciosa. Aunque este problema no afecta específicamente a la dosimetría biológica, pareció esencial destacar los requisitos de mínimos de seguridad microbiológica, química y óptica.

- c) La obtención de al menos una curva de calibración apropiada dentro del laboratorio de servicios es una condición esencial para la estimación de la dosis. En particular, la curva se tiene que obtener con los mismos protocolos que el laboratorio utiliza en todas las evaluaciones de la dosis. En los informes deben figurar las condiciones experimentales del ajuste de la curva de calibración, por ejemplo, la naturaleza y calibración física de la fuente, márgenes de dosis y niveles mínimos de detección.
- d) El laboratorio de servicios no controla algunas de las condiciones, tales como la calidad de la muestra de sangre extraída y su despacho, pero a partir de su recepción tiene que manejar la muestra de forma correcta, tiene que realizar una estimación de la dosis y, por último, tiene que preparar un informe que haya sido examinado y respaldado por un experto cualificado.
- e) Por regla general, en el informe del laboratorio figurará toda la información pertinente proporcionada por el cliente, dado que esos datos podrían influir en la interpretación de las conclusiones. Hay que enumerar todas las aberraciones observadas, que se interpretarán de conformidad con el conocimiento que se tenga en ese momento de los mecanismos de la formación de aberraciones cromosómicas inducidas por la radiación.
- f) Los planes de garantía de calidad de los laboratorios de servicios abarcarán procedimientos internos encaminados a asegurar a largo plazo la exactitud y estabilidad del funcionamiento, además de evaluaciones o calibraciones cruzadas periódicas con un programa de referencia externo. Se refieren a los elementos generales siguientes: identificación y preparación de las muestras, validación de los procedimientos o métodos, medición e instrumentación, interpretación de los datos, gestión de archivos y documentación.

15.3. APLICACIÓN AL TRIAJE DE POBLACIONES

Como ya se examinó en la sección 14, siempre existe la posibilidad de que se produzcan emergencias nucleares o radiológicas con víctimas en gran escala por causas accidentales o dolosas. Después de un suceso de ese tipo, se realizarán evaluaciones clínicas de las personas, que se categorizarán sobre la base de todo signo o síntoma prodrómico de sobreexposición y de la información disponible sobre su participación en la emergencia. En esta fase temprana de la respuesta a una emergencia radiológica, la aplicación de triaje citogenético, es decir el uso de las lesiones cromosómicas para evaluar aproximadamente y con rapidez las dosis recibidas por los individuos, también resulta apropiada para complementar la categorización clínica temprana de las víctimas.

Sin embargo, con el paso del tiempo, los clínicos precisarán estimaciones más exactas de las dosis, tanto en el margen de dosis bajas, para el riesgo de efectos estocásticos tardíos, como en el de dosis altas, para anticipar las reacciones tisulares severas. En una inspección citogenética secundaria se habrá de lograr una estimación de la dosis cuantitativamente más precisa, y se deberá investigar cualquier dato sobre exposiciones heterogéneas.

Sin embargo, puede que el suceso supere los recursos del laboratorio de biodosimetría citológica que participa a escala local y se precise la intervención de otros laboratorios de la red que se haya constituido (véase la sección 14.5.3). Varios laboratorios de dosimetría biológica han realizado de modo independiente y con éxito evaluaciones rápidas de la dosis en emergencias o ejercicios con víctimas en gran escala. El planteamiento, basado esencialmente en la prueba de dicéntricos, comprendía la preplanificación, el almacenamiento de reactivos, un procesamiento simplificado de las muestras, automatización, aplicación de criterios de recuento, y establecimiento de redes con otros laboratorios de expertos. Aun respetando los principios de la norma ISO 19238 [3], para atender las necesidades de una rápida respuesta y obtención de estimaciones de dosis es necesario apartarse en algunos aspectos del protocolo exacto.

Sobre la base de esa experiencia, en 2008 se publicó una nueva norma, ISO 21243, en la que se definen los “Criterios de desempeño de los laboratorios que realicen triaje citogenético para la evaluación de víctimas en gran escala de emergencias radiológicas o nucleares. Principios generales y aplicación a la prueba de dicéntricos” [4].

La norma está redactada en forma de procedimientos que hay que adoptar para realizar el triaje con dosimetría biológica cuando los criterios requeridos para esas mediciones en general dependerán de la aplicación de los resultados: manejo médico cuando proceda, manejo de la protección radiológica, mantenimiento de registros y requisitos médicos/jurídicos. Por ejemplo, se analizaría una selección de casos para obtener evaluaciones más exactas de la exposición parcial del cuerpo a dosis altas; en segundo lugar se estimarían las dosis para las personas expuestas por debajo del umbral de efectos determinísticos, utilizando los criterios de la ISO 19238.

El contenido de la norma ISO 21243 se puede resumir del modo siguiente:

1) Antes del suceso, cada uno de los laboratorios será responsable de lo siguiente:

- a) Mantener una reserva de los reactivos necesarios y otro material fungible de laboratorio, o tener acceso inmediato a una reserva local, regional o nacional, o a un proveedor comercial que disponga de ellos.
- b) Mantener enlaces de comunicación con los servicios de atención de salud locales, regionales o nacionales.
- c) Especificar y documentar las responsabilidades, funciones e interrelaciones de todos los miembros del personal del laboratorio cuyas funciones afecten a la calidad de la respuesta de dosimetría biológica de emergencia.
- d) Conocer su capacidad máxima de procesamiento de muestras (cantidad respecto del tiempo).
- e) Mantener un programa propio de control y garantía de calidad.
- f) Participar, según proceda, en programas pertinentes de enseñanza, formación y prácticas.
- g) Participar en estudios periódicos de comparación entre laboratorios.

2) Durante el suceso:

- a) El laboratorio de referencia responsable de la estimación de la dosis pide la colaboración de otros laboratorios de la red cuando la cifra de casos que tiene que examinar supera su propia capacidad.
- b) Cuando se adopta la decisión de activar la red, el laboratorio de referencia pasa a ser el centro de las comunicaciones de la red. El laboratorio de referencia informa a los asociados acerca de las circunstancias del incidente, y conjuntamente se determina la magnitud de la cooperación requerida.
- c) El examen citogenético para la estimación de la dosis se realiza a demanda de los médicos. La selección de los casos que se examinarán se realiza en conversación con expertos en estimación citogenética de la dosis, los responsables de las operaciones y los médicos.
- d) El laboratorio de referencia y los laboratorios de la red examinan los pormenores del reparto del trabajo de dosimetría biológica.
- e) Antes de la extracción de la sangre, todos los individuos, o el médico responsable, según proceda, proporcionarán por escrito su consentimiento informado. Hay que tener especial cuidado en proteger la privacidad a todo lo largo del encargo.

- f) El laboratorio de referencia organiza la obtención de las muestras de sangre y su envío a los demás asociados, o designa a una entidad adecuada que se ocupe de hacerlo.
- g) Los resultados del examen (y a veces la estimación de la dosis) son revisados por más de un laboratorio, y la estimación de la dosis se efectúa para cada persona sobre la base de los resultados revisados.
- h) Los laboratorios asociados mandan al laboratorio de referencia los datos brutos, incluidos los datos de distribución de las aberraciones. También mandan las estimaciones de la dosis, ajustadas, cuando proceda, a la prolongación de la dosis o la heterogeneidad, obtenidas a partir de la curva de calibración propia que mejor corresponda al tipo de radiación de que se trate.
- i) El laboratorio de referencia recibe los resultados de los asociados de la red y actúa a modo de punto central de comunicaciones y enlace con los médicos.
- j) Después del examen por el personal médico, puede que se decida someter a algunos pacientes a un nuevo recuento de células para reducir la incertidumbre estadística de las estimaciones de la dosis y distinguir mejor las sobreexposiciones no homogéneas. Esos exámenes subsiguientes se realizarán de conformidad con los criterios de desempeño descritos en la norma ISO 19238.

En el diagrama de flujo (figura 48) se describen las interacciones entre el laboratorio de referencia, la red y el equipo médico en función de esas diferentes configuraciones.

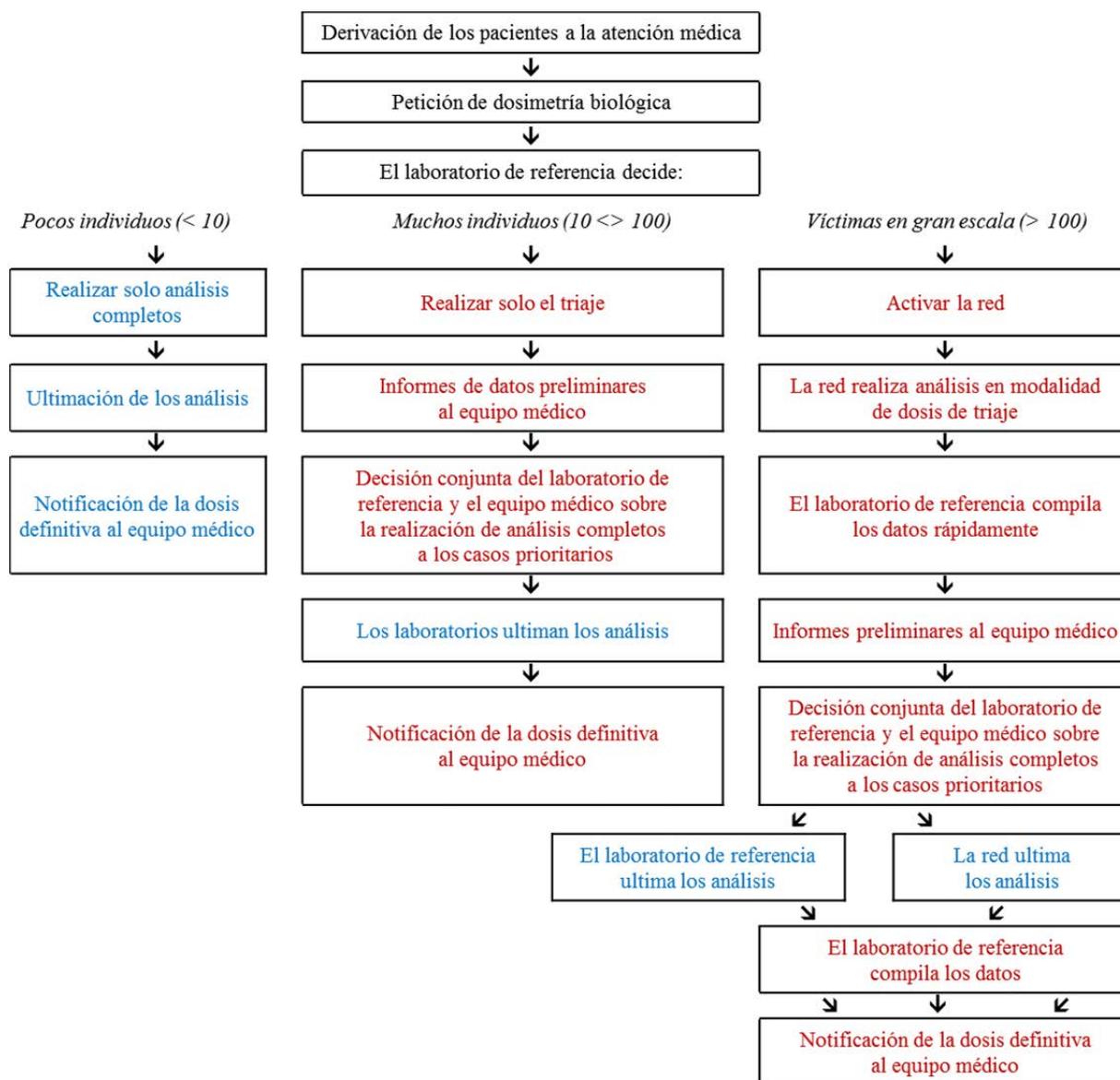


Fig. 48. Diagrama de flujo en el que se describen las interacciones entre el laboratorio de referencia de dosimetría biológica, la red y el equipo médico, en el contexto de la evaluación de la dosis de unos pocos individuos (norma ISO 19238 (azul) [3]) o de víctimas en gran escala (norma ISO 21243 (rojo) [4]) (la figura se ha tomado de la norma ISO 21243:2008 con permiso de la AFNOR en nombre de la ISO. La ISO sigue siendo el titular de los derechos de autor).

16. SEGURIDAD DEL PERSONAL DE LABORATORIO

“Bioseguridad en el laboratorio” es la expresión utilizada para describir los principios, tecnologías y prácticas de contención que se aplican para prevenir la exposición no intencionada a los patógenos y las toxinas, o su liberación accidental. Los sucesos de escala mundial registrados recientemente han puesto de relieve la necesidad de proteger los laboratorios y el material que contienen frente a acciones intencionadas que puedan dañar a las personas, el ganado, la agricultura o el medio ambiente. Por consiguiente, ha sido necesario ampliar la bioseguridad e incorporar también medidas de bioprotección en el laboratorio.

La “bioprotección en el laboratorio” describe la protección, el control y la rendición de cuentas respecto de material biológico valioso que se encuentre en el interior del laboratorio, con el fin de impedir el acceso no autorizado al mismo, su pérdida, robo, uso indebido, desviación o liberación intencional [355].

En lo que se refiere a los laboratorios de citogenética, la bioseguridad y bioprotección en el laboratorio se exponen exhaustivamente en el Manual de bioseguridad en el laboratorio, de la OMS, y en un documento conexo sobre manejo del riesgo biológico en el laboratorio, con orientaciones de bioseguridad sobre diseño e instalaciones de los laboratorios, equipo (por ejemplo, armarios de seguridad biológica), prácticas seguras de trabajo, salud ocupacional y vigilancia médica, desinfección y esterilización, manejo de los desechos, exposición a productos químicos, incendios, o seguridad eléctrica, radiológica y del equipamiento. Esa información es plenamente aplicable, y de particular utilidad, en la explotación de los laboratorios de citogenética [355, 356].

Además de a los documentos de orientación, el personal debe atenerse a su legislación y reglamentación nacional e institucional relativas las prácticas de trabajo inocuas y seguras en el laboratorio.

A continuación figura una serie de nociones sobre seguridad en los laboratorios de citogenética que merece la pena poner de relieve.

16.1. INFECCIONES

Hay que adoptar y aplicar siempre precauciones generales cuando se maneja sangre humana, y todas las muestras se deberán considerar potencialmente infecciosas. Las muestras se desempaquetarán y manipularán en cámaras de seguridad biológica apropiadamente utilizadas, mantenidas y certificadas.

Hay que limitar el uso de objetos punzocortantes, por ejemplo, agujas hipodérmicas, para reducir el riesgo de pinchazos. Los objetos punzocortantes contaminados se recogerán siempre en recipientes a prueba de pinchazos dotados de tapa y tratados como desechos infecciosos. Hay que disponer de desinfectantes adecuados, para limpiar los derrames y descontaminar las superficies de trabajo después del procesamiento de las muestras. Antes de su disposición final, todos los desechos biológicos y los recipientes de plástico desechables utilizados se deben esterilizar, por ejemplo al autoclave. Si es necesario retirar del laboratorio desechos infecciosos, para su descontaminación y disposición final, se transportarán en recipientes sellados, a prueba de fugas, conforme a la reglamentación nacional o internacional, según corresponda [356].

Si una determinada vacuna o toxoide está autorizada y se dispone de ella localmente, se ofrecerá después de haber realizado una evaluación apropiada del riesgo de posible exposición y una evaluación clínica de la salud del individuo [356].

16.2. PROTECCIÓN OCULAR

En ciertos procedimientos puede ser necesario utilizar luz ultravioleta (UV).

Las luces UV no requieren el uso de cámaras de bioseguridad. Si se utilizan, se deben limpiar a menudo, para retirar cualquier resto de polvo o suciedad que puedan reducir la eficacia del efecto germicida de la luz. Cuando se utilice luz UV, se deberá apagar cuando en la pieza haya personas, para proteger los ojos y la piel frente a exposiciones accidentales [356].

Si se utilizan lámparas UV en la exposición de preparaciones durante el procedimiento de tinción FPG, habrá que disponer un blindaje y aplicar procedimientos de trabajo que impidan la irradiación directa de la piel o los ojos del personal de laboratorio.

En general, los microscopios de fluorescencia están diseñados para que en una utilización normal sean seguros.

16.3. PRODUCTOS QUÍMICOS

En los procedimientos a los que se refiere la presente publicación se utilizan sistemáticamente determinados productos químicos refinados. En el Manual de bioseguridad en el laboratorio, de la OMS, parte IX [356, parte IX] figura más información sobre productos químicos peligrosos y seguridad química, así como una lista completa de productos químicos en la que se detallan los peligros que entrañan y las precauciones que hay que adoptar.

Los productos químicos y farmacéuticos presentes en los cultivos o utilizados en los procedimientos de tinción suelen usarse en pequeñas cantidades y en diluciones que en general no suponen un peligro para la salud. Sin embargo, se preparan y se almacenan a partir de soluciones madre concentradas. Los principales reactivos que son motivo de preocupación y las correspondientes frases de riesgo (frases R) acordadas internacionalmente se enumeran en el cuadro 19.

Las existencias de productos químicos en el laboratorio se deberían limitar a las cantidades necesarias para el uso cotidiano. Las existencias a granel se deben conservar en salas o edificios designados a ese efecto.

¡No hay que guardar los productos químicos por orden alfabético! [356]

CUADRO 19. PRINCIPALES REACTIVOS QUE SON MOTIVO DE PREOCUPACIÓN EN DOSIMETRÍA BIOLÓGICA DE LABORATORIO Y SUS FRASES DE RIESGO ACORDADAS INTERNACIONALMENTE

Reactivo	Frase de riesgo (número R ^a)
Ácido acético	10; 25.
Ácido clorhídrico	34; 37
Ácido okadaico	23; 24; 25; 38
Bencilpenicilina	42; 43
Bromodesoxiuridina	20; 21; 22; 46; 61
Caliculina A	23; 24; 25; 38
Citocalasina B	26; 27; 28; 63
Colcemid	25; 63

Reactivo	Frase de riesgo (número R ^a)
DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)	36; 37; 38
DMSO (dimetil sulfóxido)	36; 37; 38
Fitohemaglutinina	20; 21; 22; 43
Formaldehído	23; 24; 25; 34; 40; 43
Formamida	37; 38; 41; 61
Heparina	36; 37; 38
Hidróxido de bario	20; 22; 34
Hidróxido de sodio	35
Hypaque	42; 43
Metanol	11; 23; 24; 25; 39
Naranja de acridina	36; 37; 38
Pepsina	36; 37; 38; 42
Ribonucleasa A	20; 21; 22; 38
Sulfato de estreptomicina	20; 21; 22; 61
Tinción de Giemsa	20; 21; 22; 40; 41
Tinción de Hoechst	23; 24; 25; 36; 37; 38
Xileno	10; 20; 21; 38

^a R 10: inflamable

R 11: fácilmente inflamable

R 20: nocivo por inhalación

R 21: nocivo en contacto con la piel

R 22: nocivo por ingestión

R 23: tóxico por inhalación

R 24: tóxico en contacto con la piel

R 25: tóxico por ingestión

R 26: muy tóxico por inhalación

R 27: muy tóxico en contacto con la piel

R 28: muy tóxico por ingestión

R 34: provoca quemaduras

R 35: provoca quemaduras graves

R 36: irrita los ojos

R 37: irrita las vías respiratorias

R 38: irrita la piel

R 39: peligro de efectos irreversibles muy graves

R 40: indicios limitados de efectos carcinogénicos

R 41: riesgo de lesiones oculares graves

R 42: posibilidad de sensibilización por inhalación

R 43: posibilidad de sensibilización en contacto con la piel

R 46: puede causar alteraciones genéticas hereditarias

R 61: riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto

R 63: posible riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto

REFERENCIAS

- [1] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment, Technical Reports Series No. 260, IAEA, Vienna (1986).
- [2] TURAI, I., The IAEA's co-ordinated research project on biodosimetry, 1998–2000, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **52** (2000) 1113–1116.
- [3] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, Radiation Protection-Performance Criteria for Service Laboratories Performing Biological Dosimetry by Cytogenetics, ISO 19238, ISO, Geneva (2004).
- [4] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, Radiation Protection-Performance Criteria for Laboratories Performing Cytogenetic Triage for Assessment of Mass Casualties in Radiological or Nuclear Emergencies-General Principles and Application to Dicentric Assay, ISO 21243, ISO, Geneva (2008).
- [5] FENECH, M., *et al.*, HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutat. Res.* **534** (2003) 65–75.
- [6] ROJAS-PALMA, C., *et al.* (Eds) TMT Handbook, Triage, Monitoring and Treatment of People Exposed to Ionizing Radiation Following a Malevolent Act, Lobo Media AS, Norway (2009).
- [7] BERTHO, J.M., *et al.*, New biological indicators to evaluate and monitor radiation-induced damage: an accident case report, *Radiat. Res.* **169** (2008). 543–550
- [8] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A Manual, Technical Reports Series No. 405, IAEA, Vienna (2001).
- [9] HUBBLE, J.H., Photon mass attenuation and energy — Absorption coefficients from 1 keV to 20 MeV, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **33** (1982) 1269–1290.
- [10] GRAY, L.H., An ionization method for the absolute measurement of gamma-ray energy, *Proc. Soc. Lond.*, **A156** (1936) 578–596.
- [11] DENG, W., MORRISON, D.P., GALE, K.L., LUCAS, J.N., Biological dosimetry of beta-ray exposure from tritium using chromosome translocations in human lymphocytes analyzed by fluorescence in situ hybridization, *Radiat. Res.* **150** (1998) 400–405.
- [12] INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS, Quantities and Units in Radiation Protection Dosimetry, ICRU Rep. **51** (1993).
- [13] STRAUME, T., High-energy gamma rays in Hiroshima and Nagasaki: Implications for risk and W_R , *Health Phys.* **69** (1995) 954–956.
- [14] SCHMID, E., BAUCHINGER, M., LET dependence of dicentric yields in human lymphocytes induced by low doses of sparsely ionizing radiations and its implication for risk assessments, *Health Phys.* **74** (1998) 719–721.
- [15] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, WORLD HEALTH ORGANIZATION, Generic procedures for medical response during a nuclear or radiological emergency, EPR-MEDICAL, IAEA, Vienna (2005).
- [16] LEA, D.E., *Actions of Radiation on Living Cells*, 2nd edn, Cambridge University Press, Cambridge, UK (1956).
- [17] GOODHEAD, D.T., The initial physical damage produced by ionizing radiations, *Int. J. Radiat. Biol.* **56** (1989) 623–634.
- [18] EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., PURROTT, R.J., “Dicentric chromosome aberration yield in human lymphocytes and radiation quality. A resume including recent results using alpha particles”, *Microdosimetry (Proc. 7th Symp. Harwood Academic, Oxford, 1980)*, Vol. 2 (BOOZ, J., EBERT, H.G., HARTFIEL, H.D., Eds), Harwood Academic Publishers, Brussels and Luxembourg (1981) 1263–1273.

- [19] COMISIÓN INTERNACIONAL DE PROTECCIÓN RADIOLÓGICA, *Las Recomendaciones 2007 de la Comisión Internacional de Protección Radiológica*, Publicación ICRP 103, Sociedad Española de Protección Radiológica, con la autorización de la ICRP, Senda Editorial S.A., Madrid, 2008).
- [20] NOWELL, P.C., Phytohemagglutinin — An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes, *Cancer Res.* **20** (1960) 462–466.
- [21] CARSTAIRS, K., The human small lymphocyte — its possible pluripotential quality, *Lancet* (1962) 829–832.
- [22] WUESTERMANN, P.R., CRONKITE, E.P., Physiological and pathophysiological aspects of the immune system contributing to a biomathematical model of lymphocytes, *Stem Cells* **13** Suppl. 1 (1995) S268–S275.
- [23] CHENG, C. K-W., CHAN, J., CEMBROWSKI, G.S., VAN ASSENDELFT, O.W., Complete blood count reference interval diagrams derived from NHANES III: Stratification by age, sex, and race, *Lab. Haematol.* **10** (2004) 42–53.
- [24] DAINIAK, N., WASELENKO, J.K., ARMITAGE, J.O., MacVITTEE, T.J., FARESE, A.M., The hematologist and radiation casualties, *Hematology*, **2003** (2003) 473–496.
- [25] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Diagnosis and Treatment of Radiation Injuries*, Safety Report Series No. 2, IAEA, Vienna (1998).
- [26] McLEAN, A.R., MICHIE, C.A., In vivo estimates of division and death rates of human T lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92** (1995) 3707–3711.
- [27] BOGEN, K.T., Reassessment of human peripheral T-lymphocyte life span deduced from cytogenetic and cytotoxic effects of radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* **64** (1993) 195–204.
- [28] OBE, G., BEEK, B., DUDIN, G., The human leukocyte test system: V. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 3-day cultures, *Humangenetik* **28** (1975) 295–302.
- [29] PAULSON, J.R., LAEMMLI, U.K., The structure of histone-depleted metaphase chromosomes, *Cell* **12** (1977) 817–828.
- [30] CREMER, C., *et al.*, Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations, *Mutat. Res.* **366** (1996) 97–116.
- [31] SCHAFFER, L.G., TOMMERUP, N. (Eds), *Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*, ISCN, Karger, Basel (2005).
- [32] MORTON, N.E., Parameters of the human genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88** (1991) 7474–7476.
- [33] CARRANO, A.V., Induction of chromosomal aberrations in human lymphocytes by X rays and fission neutrons: Dependence on cell cycle stage, *Radiat. Res.* **63** (1975) 403–421.
- [34] MÜLLER, H.J., Artificial transmutation of the gene, *Science* **66** (1927) 84–87.
- [35] PAINTER, T.S., MÜLLER, H.J., Parallel cytology and genetics of induced translocations and deletions in *Drosophila*, *J. Hered.* **20** (1929) 287–298.
- [36] SAX, K., Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by X-rays, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **9** (1941) 93–103.
- [37] REVELL, S.H., “A new hypothesis for chromatid exchanges”, *Radiobiology (Proc. Symp. Liège, 1954)*, Butterworths, London (1955) 243–253.
- [38] CHADWICK, K.H., LEENHOUTS, H.P., The rejoining of DNA double-strand breaks and a model for the formation of chromosomal rearrangements, *Int. J. Radiat. Biol.* **33** (1978) 517–529.
- [39] MOZUMDER, A., MAGEE J.L., Model of tracks of ionizing radiations for radical reaction mechanisms, *Radiat Res.* **28** (1966) 203–14.
- [40] GEORGAKILAS, A.G., Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge, *Mol. BioSyst.*, **4** (2008) 30–35.

- [41] JAEA R&D REVIEW, Dependency of yield of DNA damage refractory to enzymatic repair on ionization and excitation density of radiation – Exploring the induction mechanism of clustered DNA damage, (2007).
http://jolisfukyu.tokai-sc.jaea.go.jp/fukyu/mirai-en/2007/6_5.html
- [42] WARD, J.F., DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation and repairability, *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **35** (1988) 95–135.
- [43] RYDBERG, B., Radiation-induced DNA damage and chromatin structure, *Acta Oncol.* **40** (2001) 682–685.
- [44] FORTINI, P., DOGLIOTTI, E., Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short and long-patch repair subpathways, *DNA Repair* **6** (2007) 398–409.
- [45] CALDECOTT, K.W., Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin, *DNA Repair* **6** (2007) 443–453.
- [46] IDE, H., *et al.*, Repair of DNA-protein crosslink damage: Coordinated actions of nucleotide excision repair and homologous recombination, *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)* **52** (2008) 57–58.
- [47] JEGGO, P.A., LÖBRICH, M., Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability, *DNA Repair* **5** (2006) 1192–1198.
- [48] WYMAN, C., KANAAR, R., Homologous recombination: down to the wire, *Curr. Biol.* **14** (2004) R629–R631;
- [49] HEFFERIN, M.L., TOMKINSON, A.E., Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining, *DNA Repair* **4** (2005) 639–648.
- [50] ROTHKAMM, K., KRÜGER, I., THOMPSON, L.H., LÖBRICH, M., Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle, *Mol. Cell. Biol.* **23** (2003) 5706–5715.
- [51] SASAKI, M.S., Advances in the biophysical and molecular bases of radiation cytogenetics, *Int. J. Radiat. Biol.* **85** (2009) 26–47.
- [52] SAVAGE, J.R.K., Annotation: Classification and relationships of induced chromosomal structural changes, *J. Med. Genet.* **13** (1976) 103–122.
- [53] EVANS, H.J., Chromosome aberrations induced by ionizing radiations, *Int. Rev. Cytol.* **13** (1962) 221–321.
- [54] MESTRES, M., *et al.*, Analysis of alpha-particle induced chromosome aberrations in human lymphocytes, using pan-centromeric and pan-telomeric probes, *Int. J. Radiat. Biol.* **80** (2004) 737–744.
- [55] BENKHALED, L., *et al.*, Analysis of gamma-rays induced chromosome aberrations: a fingerprint evaluation with a combination of pan-centromeric and pan-telomeric probes, *Int. J. Radiat. Biol.* **82** (2006) 869–875.
- [56] GEBHART, E., Double minutes, cytogenetic equivalents of gene amplification in human neoplasia: a review, *Clinical and Translational Oncology* **7** (2005) 477–485.
- [57] BLOOM, A.D., NEEL, J.V., CHOI, K.W., IDA, S., CHAGNON, N., Chromosome aberrations among the Yanomama Indians, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66** (1970) 920–927.
- [58] AWA, A.A., NEEL, J.V., Cytogenetic “rogue” cells: what is their frequency, origin and evolutionary significance? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986) 1021–1025.
- [59] SEVAN’KAEV, A.V., *et al.*, Rogue cells observed in children exposed to radiation from the Chernobyl accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **63** (1993) 361–367.
- [60] NEEL, J.V., AWA, A.A., KODAMA, Y., NAKANO, M., MABUCHI K., Rogue lymphocytes among Ukrainians not exposed to radioactive fall-out from the Chernobyl accident: the possible role of this phenomenon in oncogenesis, teratogenesis and mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992) 6973–6977.

- [61] NEEL, J.V., *et al.*, Hypothesis: “rogue cell”-type chromosomal damage in lymphocytes is associated with infection with the JC human polyoma virus and has implications for oncogenesis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 2690–2695.
- [62] FOMINA, J., DARROUDI, F., BOEI, J. J., NATARAJAN, A.T., Discrimination between complete and incomplete chromosome exchanges in X-irradiated human lymphocytes using FISH with pan-centromeric and chromosome specific DNA probes in combination with telomeric PNA probe, *Int. J. Radiat. Biol.* **76** (2000) 807–813.
- [63] BUCKTON, K.E., SMITH, P.G., COURT BROWN, W.M., “The estimation of lymphocyte lifespan from studies on males treated with X-rays for ankylosing spondylitis”, *Human Radiation Cytogenetics (Proc. Conf. Edinburgh, 1966)* (EVANS, H.J., COURT BROWN, W.M., McLEAN, A.S., Eds), North-Holland, Amsterdam (1967) 106–114.
- [64] EDWARDS, A.A., *et al.*, Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications, *Radiat. Prot. Dosim.* **113** (2005) 396–402.
- [65] DURAN, M., BARQUINERO, J.F., CABALLIN, M.R, RIBAS, M., BARRIOS, L., Persistence of radiation-induced chromosome aberrations in a long-term cell culture, *Radiat. Res.* **171** (2009) 425–437.
- [66] PANTELIAS, G.E., MAILLIE, H.D., A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol, *Somat. Cell. Genet.* **9** (1983) 533–547.
- [67] PANTELIAS, G.E., MAILLIE, H.D., The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry, *Radiat. Res.* **99** (1984) 140–150.
- [68] KANDA, R., HAYATA, I., LLOYD, D.C., Easy biodosimetry for high-dose radiation exposure using drug-induced, prematurely condensed chromosomes, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 441–446.
- [69] DURANTE, M., FURUSAWA, Y., GOTOH, E., A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 457–462.
- [70] VYAS, R.C., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., Radiation-induced chromosomal breakage and rejoining in interphase-metaphase chromosomes of human lymphocytes, *Mutat. Res.* **249** (1991) 29–35.
- [71] PANTELIAS, G.E., MAILLIE, H.D., Direct analysis of radiation induced chromosome fragments and rings in unstimulated human peripheral blood lymphocytes by means of the premature chromosome condensation technique, *Mutat. Res.* **149** (1985) 67–72.
- [72] DARROUDI, F., FOMINA, J., MEIJERS, M., NATARAJAN, A.T., Kinetics of formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH, *Mutat. Res.* **404** (1998) 55–65.
- [73] WALDREN, C.A., JOHNSON, R.T., Analysis of interphase chromosome damage by means of premature chromosome condensation after X and UV irradiation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71** (1974) 1137–1141.
- [74] GOTOH, E., DURANTE, M., Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools, *J. Cell Physiol.* **209** (2006) 297–304.
- [75] BLAKELY, W.F., PRASANNA, P.G.S., KOLANKO, C.J., PYLE, M.D., MOSBROOK, D.M., LOATS, A.S., RIPPEON, T.L., LOATS, H., Application of the premature chromosome condensation assay in simulated partial-body radiation exposures: evaluation of the use of an automated metaphase-finder, *Stem Cells Suppl.* **1** (1995) S223–S230.

- [76] PRASANNA, P.G.S., ESCALADA, N.D., BLAKELY, W.F., Induction of premature chromosome condensation by a phosphatase inhibitor and a protein kinase in unstimulated human peripheral blood lymphocytes: a simple and rapid technique to study chromosome aberrations using specific whole-chromosome DNA hybridization probes for biological dosimetry, *Mutat. Res.* **466** (2000) 131–141.
- [77] PRASANNA, P.G.S., BLAKELY, W.F., “Premature chromosome condensation in human resting peripheral blood lymphocytes for chromosome aberration analysis using specific whole-chromosome DNA hybridization probes”, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 291 *Methods in Molecular Biology* (KEOHAVONG, P., GRANT, S.G., Eds), Humana Press, Totowa, NJ (2004) 49–57.
- [78] PATHAK, R., RAMAKUMAR, A., SUBRAMANIAN, U., and PRASANNA, P.G.S., Differential radio-sensitivities of human chromosomes 1 and 2 in interphase- and metaphase–spreads after ^{60}Co γ -irradiation in one human donor, *BMC Med. Phys.* **9** (2009) 1–8.
- [79] PANTELIAS, G.E., ILIAKIS, G.E., SAMBANI, C.D., POLITIS, G., Biological dosimetry of absorbed radiation by C-banding of interphase chromosomes in peripheral blood lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **63** (1993) 349–354.
- [80] LAMADRID, A.I., GARCIA, O., DELBOS, M., VOISIN, P., ROY L., PCC-ring induction in human lymphocytes exposed to gamma and neutron irradiation, *J. Radiat. Res.* **48** (2007) 1–6.
- [81] GOTOH, E., TANNO, Y., TAKAKURA, K., Simple biodosimetry method for use in cases of high-dose radiation exposure that scores the chromosome number of Giemsa-stained drug-induced prematurely condensed chromosomes (PCC), *Int. J. Radiat. Biol.* **81** (2005) 33–40.
- [82] COUNTRYMAN, P.I., HEDDLE, J.A., The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutat. Res.* **41** (1976) 321–331.
- [83] FENECH, J., MORLEY, A.A., Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.* **147** (1985) 29–36.
- [84] FENECH, J., MORLEY, A.A., Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of *in vivo* ageing and low-dose X-irradiation, *Mutat. Res.* **161** (1986) 193–198.
- [85] VRAL, A., THIERENS, H., DE RIDDER, L., *In vitro* micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 61–68.
- [86] FENECH, M., Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 1084–1104.
- [87] WILLEMS, P., *et al.*, Automated micronucleus (MN) scoring for population triage in case of large scale radiation events, *Int. J. Radiat. Biol.* **86** (2010) 2–11.
- [88] FENECH, M., The cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry, *Health Phys.* **98** (2009) 234–243.
- [89] THOMAS, P., UMEKAGI, K., FENECH, M., Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutagenesis.* **18** (2003) 187–94.
- [90] TAMURA, H., SUGIYAMA, Y., SUGAHARA, T., Changes in the number of circulating lymphocytes with chromosomal aberrations following a single exposure of the pelvis to γ -irradiation in cancer patients, *Radiat. Res.* **59** (1974) 653–657.
- [91] BREWEN, L.G., PRESTON, R.J., LITTLEFIELD, L.G., Radiation-induced human chromosome aberration yields following an accidental whole-body exposure to ^{60}Co γ -rays, *Radiat. Res.* **49** (1972) 647–656.

- [92] GRANATH, F., *et al.*, Retrospective dose estimates in Estonian Chernobyl clean-up workers by means of FISH, *Mutat. Res.* **369** (1996) 7–12.
- [93] WORLD HEALTH ORGANISATION, Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances, 009-2010 WHO/HSE/EPR/2008.10, WHO, Geneva (2008).
- [94] WILKINS, R.C., *et al.*, Interlaboratory comparison of the dicentric chromosome assay for radiation biodosimetry in mass casualty events, *Radiat. Res.* **169** (2008) 551–560.
- [95] FABRY, L., LEMAIRE, M., Dose response relationships for radiation induced chromosome aberrations in human lymphocytes *in vivo* and *in vitro*, *Strahlentherapie* **162** (1986) 63–67.
- [96] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., PROSSER, J.S., CORP, M.J., The dose response relationship obtained at constant irradiation times for the induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by cobalt-60 gamma rays, *Radiat. Environ. Biophys.* **23** (1984) 179–189.
- [97] MYSKA, J.C., *et al.*, Arrays for Use at the Cobalt Irradiation Facility, TR97-2, Armed Forces Radiobiology Research Institute (1997), <http://www.usuhs.mil/afri/outreach/reports/pdf/TR97-2.pdf>
- [98] EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., PURROT, R.J., Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution, *Radiat. Environ. Biophys.* **16** (1979) 89–100.
- [99] RAO, C.R., CHAKRAVARTI, I.M., Some small sample tests of significance for a Poisson distribution, *Biometrics* **12** (1956) 264–282.
- [100] SAVAGE, J.R.K., Sites of radiation induced chromosome exchanges, *Curr. Top. Radiat. Res.* **6** (1970) 129–194.
- [101] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., “Chromosome aberrations in human lymphocytes: effect of radiation quality, dose and dose rate”, *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man* (ISHIHARA, T., SASAKI, M.S., Eds), Alan R. Liss, New York (1983) 23–49.
- [102] BARQUINERO, J.F., *et al.*, Establishment and validation of a dose-effect curve for gamma-rays by cytogenetic analysis, *Mutat. Res.* **326** (1995) 65–69.
- [103] DI GIORGIO, M., *et al.*, Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by heavy charged particles in track segment mode, *Radiat. Prot. Dosim.* **108** (2004) 47–53.
- [104] PAPWORTH, D.G., Curve fitting by maximum likelihood, *Radiat. Bot.* **15** (1975) 127–140.
- [105] MERKLE, W., Statistical methods in regression and calibration analysis of chromosome aberration data, *Radiat. Environ. Biophys.* **21** (1983) 217–233.
- [106] LLOYD, D.C., PURROTT, R.J., REEDER, E.J., The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people, *Mutat. Res.* **72** (1980) 523–532.
- [107] SIGURDSON, A.J., *et al.*, International study of factors affecting human chromosome translocations, *Mutat. Res.* **652** (2008) 112–121.
- [108] FENECH, M., The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutat. Res.* **285** (1993) 35–44.
- [109] PETERSON, L.E., PIRLS, Poisson iteratively reweighted least squares computer program for additive, multiplicative, power, and non-linear models, *J. Stat. Soft.* **2** (1997) 1–28.
- [110] AINSBURY, E.A., BARQUINERO J.F., Biodosimetric tools for a fast triage of people accidentally exposed to ionising radiation: statistical and computational aspects, *Ann. Ist Super Sanita*, **45** (2009) 307–12.
- [111] DEPERAS, J., *et al.*, CABAS: a freely available PC program for fitting calibration curves in chromosome aberration dosimetry, *Radiat. Prot. Dosim.* **124** (2007) 115–123.
- [112] AINSBURY, E.A., LLOYD, D.C., Dose estimation software for radiation biodosimetry, *Health Phys.* **98** (2010) 290–295.

- [113] PURROTT, R.J., VULPIS, N., LLOYD, D.C., Chromosome dosimetry: The influence of culture media on the proliferation of irradiated and unirradiated human lymphocytes, *Radiat. Prot. Dosim.* **1** (1981) 203–208.
- [114] PERRY, P., WOLFF, S., New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature* **251** (1974) 156–158.
- [115] LAMBERT, B., HANSSON, K., LINDSTEN, J., STEN, M., WERELIUS, B., Bromodeoxyuridine-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes, *Hereditas* **93** (1976) 163–174.
- [116] PROSSER, J.S., MOQUET, J.E., The effect of blood storage on differential chromosome staining of human lymphocytes, *Experientia* **39** (1983) 778–780.
- [117] HAYATA, I., KAJIMA, J., OKABE, N., Distribution of metaphases in the 1st cell-cycle for automated-system in radiation-dosimetry, *Radiat. Phys. Chem.* **39** (1992) 517–520.
- [118] WILKINSON, D.T., *et al.*, Canadian biodosimetry capacity for response to radiation emergencies, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1128–1132.
- [119] STRICKLIN, D., *et al.*, An initial limited biodosimetry inter-comparison exercise: FOI and DRDC Ottawa, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1133–1137.
- [120] PURROTT, R.J., VULPIS, N., LLOYD, D.C., The influence of incubation temperature on the rate of human lymphocyte proliferation *in vitro*, *Experientia* **37** (1981) 407–408.
- [121] MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMANN, W.J., BATTIPS, D.M., HUNGERFORD, D.A., Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood, *Exp. Cell Res.* **20** (1960) 613–616.
- [122] HUNGERFORD, D.A., Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl, *Stain Technol.* **40** (1965) 333–338.
- [123] HAYATA, I., *et al.*, Robot system for preparing lymphocyte chromosomes, *J. Radiat. Res.* **33** Suppl. (1992) S231–S241.
- [124] McFEE, A.F., SAYER, A.M., SALOMAA, S.I., LINDHOLM, C., LITTLEFIELD, L.G., Methods for improving the yield and quality of metaphase preparations for FISH probing of human lymphocyte chromosomes, *Environ. Molecul. Mutagen.* **29** (1997) 98–104.
- [125] SASAKI, M.S., “Radiation damage and its repair in the formation of chromosome aberrations in human lymphocytes”, *Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man* (EVANS, H.J., LLOYD, D.C., Eds), Edinburgh University Press, Edinburgh 62-76 (1978).
- [126] SCOTT, D., LYONS, C.Y., Homogeneous sensitivity of human peripheral blood lymphocytes to radiation-induced chromosome damage, *Nature* **279** (1979) 756–758.
- [127] KOLIN-GERRESHEIM, J., BAUCHINGER, M., Dependence of the frequency of harlequin-stained cells on BrdU concentration in human lymphocyte cultures, *Mutat. Res.* **91** (1981) 251–254.
- [128] HAYATA, I., Removal of stainable cytoplasmic substances from cytogenetic slide preparations, *Biotechn. Histochem.* **68** (1993) 150–152.
- [129] LATT, S.A., Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70** (1973) 3395–3399.
- [130] FERNANDES, T.S., LLOYD, D., AMARAL, A., A comparison of different cytological stains for biological dosimetry, *Int. J. Radiat. Biol.* **84** (2008) 703–711.
- [131] SAVAGE, J.R.K., PAPWORTH, D.G., Constructing a 2B calibration curve for retrospective dose reconstruction, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 69–76.
- [132] SZŁUIŃSKA, M., EDWARDS, A., LLOYD, D., Presenting statistical uncertainty on cytogenetic dose estimates, *Radiat. Prot. Dosim.* **123** (2007) 443–449.
- [133] CROW, E.L., GARDNER, R.S., Confidence intervals for the expectation of a Poisson variable, *Biometrika* **46** (1959) 441–453.

- [134] SCHENKER, N., GENTLEMAN, J.F., On judging the significance of differences by examining the overlap between confidence intervals, *Am. Stat.* **55** (2001) 182–182.
- [135] AUSTIN, P.C., HUX, J.E., A brief note on overlapping confidence intervals, *J. Vas. Surg.* (2002) 194–195.
- [136] BRAME, R.S., GROER, P.G., Bayesian methods for chromosome dosimetry following a criticality accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **104** (2003) 61–63.
- [137] VOISIN P., *et al.*, Criticality accident dosimetry by chromosomal analysis, *Radiat. Prot. Dosim.* **110** (2004) 443–447.
- [138] DOLPHIN, G.W., “Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods”, *Handling of Radiation Accidents (Proc. Int. Symp. Vienna, 1969)*, IAEA, Vienna (1969) 215–224
- [139] LLOYD, D.C., PURROTT, R.J., DOLPHIN, G.W., Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation, *Phys. Med. Biol.* **18** (1973) 421–431.
- [140] BARQUINERO, J.F., *et al.*, Biological dosimetry in simulated in vitro partial irradiations, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 435–440.
- [141] VOISIN, P., *et al.*, Mathematical methods in biological dosimetry: the 1996 Iranian accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **76** (2000) 1545–1554.
- [142] SASAKI, M.S., MIYATA, H., Biological dosimetry in atom bomb survivors, *Nature* **220** (1968) 1189–1193.
- [143] BUCKTON, K.E., HAMILTON, G.E., PATON, L., LANGLANDS, A.O., “Chromosome aberrations in irradiated ankylosing spondylitis patients”, *Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man*, Edinburgh University Press, Edinburgh (1978) 142–150.
- [144] BUCKTON, K.E., Chromosome aberrations in patients treated with X-irradiation for ankylosing spondylitis, *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*, Alan R. Liss, New York (1983) 491–511.
- [145] AWA, A., Analysis of chromosome aberrations in atom bomb survivors for dose assessment: studies at the Radiation Effects Research Foundation from 1968–1993, *Stem Cells* **15** Suppl. 2 (1997) S163–S173.
- [146] LEA, D.E., CATCHESIDE, D.G., The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in *Tradescantia*, *J. Genet.* **44** (1942) 216–245.
- [147] BAUCHINGER, M., SCHMID, E., DRESP, J., Calculation of the dose-rate dependence of the dicentric yield after ⁶⁰Co-irradiation of human lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **35** (1979) 229–233.
- [148] DUFRAIN, R.J., LITTLEFIELD, L.G., JOINER, E.E., FROME, E.L., “*In vitro* human cytogenetic dose-response systems”, *The Medical Basis for Radiation Accident Preparedness*, Elsevier North-Holland, Amsterdam (1980) 358–374.
- [149] ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA, El accidente radiológico de Goiânia, OIEA, Viena (1989).
- [150] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Dosimetric and Medical Aspects of the Radiological Accident in Goiânia in 1987, IAEA-TECDOC-1009, IAEA, Vienna (1998).
- [151] EUROPEAN COMMISSION, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, WORLD HEALTH ORGANIZATION, One Decade after Chernobyl — Summing up the Consequences of the Accident (Proc. Int. Conf. Vienna, 1996), IAEA, Vienna (1996).
- [152] PROSSER, J.S., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., STATHER, J.W., The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by exposure to tritiated water in vitro, *Radiat. Prot. Dosim.* **4** (1983) 21–26.
- [153] PRESTON, R.J., BREWEN, J.G., GENGOZIAN, N., Persistence of radiation-induced chromosome aberrations in marmoset and man, *Radiat. Res.* **60** (1974) 516–524.

- [154] VOISIN, P., LLOYD, D., EDWARDS, A., Chromosome aberrations scoring for biological dosimetry in a criticality accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **70** (1997) 467–470.
- [155] BASSON, J.K., HANEKOM, A.P., COETZEE, F.C., LLOYD, D.C., Health Physics Evaluation of an Accident Involving Acute Overexposure to a Radiography Source, Rep. PEL-279, Pelindaba, South Africa (1981).
- [156] STEPHAN, G., HADNAGY, W., HAMMERMAIER, C., IMHOF, U., Biologically and physically recorded doses after an accidental exposure to ^{60}Co γ -rays, *Hlth Phys.* **44** (1983) 409–411.
- [157] ISHIHARA, T., *et al.*, Chromosome aberrations in persons accidentally exposed to ^{192}Ir gamma rays, *J. Radiat. Res.* **14** (1973) 328–335.
- [158] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, The Radiological Accident in Istanbul, IAEA, Vienna (2000).
- [159] TURAI, I., GÜNALP, B., LLOYD, D., COSSET, J.M., “Medical aspects of the radiological accident in Istanbul”, (Proc. 8th WHO/REMPAN Conf., NRPB), Oxford (2000).
- [160] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., PROSSER, J.S., Accidental intake of tritiated water: a report of two cases, *Radiat. Prot. Dosim.* **15** (1986) 191–196.
- [161] PINKEL, D., STRAUME, T., GRAY, J.W., Cytogenetic analysis using quantitative high-sensitivity fluorescence hybridisation, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **83** (1986) 2934–2938.
- [162] GREULICH, K.M., *et al.*, Rapid detection of radiation-induced chromosomal aberrations in lymphocytes and hematopoietic progenitor cells by mFISH, *Mutat. Res.* **452** (2000) 73–81.
- [163] MANTI, L., *et al.*, Rearrangements in human chromosome 1 visualized by arm-specific probes in the progeny of blood lymphocytes exposed to iron ions, *Adv. Space Res.* **39** (2007) 1066–1069.
- [164] CHUDOBA, I., *et al.*, High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes, *Cytogenet. Cell Genet.* **84** (1999) 156–160.
- [165] HORSTMANN, M., DURANTE, M., JOHANNES, C., OBE, G., Chromosomal intrachanges induced by swift iron ions, *Adv. Space Res.* (2005) **35** 276–279.
- [166] BRENNER, D.J., *et al.*, Biomarkers specific to densely-ionising (high LET) radiations, *Radiat. Prot. Dosim.* **97** (2001) 69–73.
- [167] DARROUDI, F., *et al.*, A new tool to characterize primary cervical carcinomas: to assess hall-marks and stage specificity, *Cancer Lett.* **287** (2010) 67–74.
- [168] PRIEUR, M., *et al.*, Acquired chromosome rearrangements in human lymphocytes: effect of ageing, *Human Genet.* **79** (1988) 147–150.
- [169] DARROUDI, F., Use of FISH translocations analyses for retrospective biological dosimetry: how stable are stable chromosome aberrations?, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 101–109.
- [170] LUCAS, J.N., *et al.*, Rapid translocation frequency analysis in human decades after exposure to ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* **62** (1992) 53–63.
- [171] TAWN, E.J., The non-random occurrence of exchanges involving chromosomes 7 and 14 in human lymphocytes: a prospective study of control individuals, *Mutat. Res.* **199** (1988) 215–220.
- [172] KODAMA, Y., *et al.*, Estimation of minimal size of translocated chromosome segments detectable by fluorescence in situ hybridisation, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 35–39.
- [173] SAVAGE, J.R., TUCKER, J.D., Nomenclature systems for FISH-painted chromosome aberrations, *Mutat. Res.* **366** (1996) 153–161.
- [174] LINDHOLM, C., EDWARDS A.A., Long-term persistence of translocations in stable lymphocytes from victims of a radiological accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **80** (2004) 559–566.

- [175] TUCKER, J.D., *et al.*, PAINT: A proposed nomenclature for structural aberrations detected by whole chromosome painting, *Mutat. Res.* **347** (1995) 21–24.
- [176] SAVAGE, J.R.K., SIMPSON, P., On the scoring of FISH painted chromosome exchange aberrations, *Mutat. Res.* **307** (1994) 345–353.
- [177] SAVAGE, J.R.K., SIMPSON, P., FISH ‘painting’ patterns resulting from complex exchanges, *Mutat. Res.* **312** (1994) 51–60.
- [178] KNEHR, S., ZITZELSBERGER, H., BAUCHINGER, M., FISH-based analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using different nomenclature systems, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 135–141.
- [179] NATARAJAN, A.T., VYAS, R.C., DARROUDI, F., VERMEULEN, S., Frequencies of x-ray induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by in situ hybridization using chromosome-specific DNA libraries, *Int. J. Radiat. Biol.* **61** (1992) 199–203.
- [180] SIMPSON, P.J., SAVAGE, J.R.K., Dose–response curves for simple and complex chromosome aberrations induced by X-rays and detected using fluorescence in situ hybridisation, *Int. J. Radiat. Biol.* **69** (1996) 429–436.
- [181] SIMPSON, P.J., PAPWORTH, D.G., SAVAGE, J.R., X-ray-induced simple, pseudosimple and complex exchanges involving two distinctly painted chromosomes, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 11–18.
- [182] CORNFORTH, M.N., Analyzing radiation-induced complex chromosome rearrangements by combinatorial painting, *Radiat. Res.* **155** (2001) 643–659.
- [183] LUCAS, J.N., DENG, W., Views on issues in radiation biodosimetry based on chromosome translocations measured by FISH, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 77–86.
- [184] KNEHR, S., ZITZELSBERGER, H., BRASELMANN, H., NAHRSTEDT, U., BAUCHINGER, M., Chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization: further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations, *Int. J. Radiat. Biol.* **70** (1996) 385–392.
- [185] BARQUINERO, J.F., KNEHR, S., BRASELMANN, H., FIGELI, M., BAUCHINGER, M., DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization painting of all chromosomes of a human female karyotype, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 315–323.
- [186] CIGARRAN, S., *et al.*, Relationship between the DNA content of human chromosomes and their involvement in radiation-induced structural aberrations analysed by painting, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 449–455.
- [187] WU, H., DURANTE, M., LUCAS, J.N., Relationship between radiation-induced aberrations in individual chromosomes and their DNA content: effects of interaction distance, *Int. J. Radiat. Biol.* **77** (2001) 781–786.
- [188] CORNFORTH, M.N., *et al.*, Chromosomes are predominantly located randomly with respect to each other in interphase human cells, *J. Cell. Biol.* **159** (2002) 237–244.
- [189] WHITEHOUSE, *et al.*, Translocation yields in peripheral blood lymphocytes from control populations, *Int. J. Radiat. Biol.* **81** (2005) 139–145.
- [190] PRESSL, S., EDWARDS, A. STEPHAN, G., The influence of age, sex and smoking habits on the background level of FISH-detected translocations, *Mutat. Res.* **442** (1999) 89–95.
- [191] RAMSEY, M.J., *et al.*, The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutat. Res.* **338** (1995) 95–106.
- [192] BADR, F.M., HUSSAIN, F.H., Chromosomal aberrations in chronic male alcoholics, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **6** (1982) 122–129.
- [193] BURIM, R.V., *et al.*, Clastogenic effect of ethanol in chronic and abstinent alcoholics, *Mutat. Res.* **560** (2004) 187–198.

- [194] BOTHWELL, A.M., WHITEHOUSE, C.A., TAWN, E.J., The application of FISH for chromosome aberration analysis in relation to radiation exposure, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 7–14.
- [195] TAWN, E.J., CARTMELL, C.L., The effect of smoking on the frequencies of asymmetrical and symmetrical chromosome exchanges in human lymphocytes, *Mutat. Res.* **224** (1989) 151–156.
- [196] VAN DIEMEN, P.C.M., MAASDAM, D., VERMEULEN, S., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., Influence of smoking habits on the frequencies of structural and numerical chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes using the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique, *Mutagenesis* **10** (1995) 487–495.
- [197] TUCKER, J.D., *et al.*, Multi-endpoint biological monitoring of phosphine workers, *Mutat. Res.* **536** (2003) 7–14.
- [198] MAENG, S.H., *et al.*, Chromosome aberration and lipid peroxidation in chromium-exposed workers, *Biomarkers* **9** (2004) 418–434.
- [199] BESKID, O., *et al.*, Chromosomal aberrations by fluorescence in situ hybridization (FISH) — Biomarker of exposure to carcinogenic PAHs, *Mutat. Res.* **620** (2007) 62–70.
- [200] PLUTH, J.M., RAMSEY, M.J., TUCKER, J.D., Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies, *Mutat. Res.* **465** (2000) 101–111.
- [201] STEENLAND, K., *et al.*, Thyroid hormones and cytogenetic outcomes in backpack sprayers using ethylenebis (dithiocarbamate) (EBDC) fungicides in Mexico, *Environ. Hlth Perspect.* **105** (1997) 1126–1130.
- [202] KIM Y. K., *et al.*, Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms, *Pharmacogenetics* **14** (2004) 453–463.
- [203] SMITH, M. T., *et al.*, Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene, *Cancer Res.* **58** (1998) 2176–2181.
- [204] ZHANG, L., *et al.*, Aberrations in chromosomes associated with lymphoma and therapy-related leukemia in benzene-exposed workers, *Environ. Mol. Mutagen.* **48** (2007) 467–474.
- [205] BESKID, O., DUSEK, Z., SOLANKSY, I., SRAM, R.J., The effects of exposure to different clastogens on the pattern of chromosomal aberrations detected by FISH whole chromosome painting in occupationally exposed individuals, *Mutat. Res.* **594** (2006) 20–29.
- [206] SRAM R.J., *et al.*, Environmental exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons-The interpretation of cytogenetic analysis by FISH, *Toxicol. Lett.* **172** (2007) 12–20.
- [207] DOHERTY, A.T., *et al.*, Increased chromosome translocations and aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients having revision arthroplasty of the hip, *J. Bone Joint Surg.* **83** (2001) 1075–1081.
- [208] DULOUT, F.N., *et al.*, Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water, *Mutat. Res.* **370** (1996) 151–158.
- [209] NATARAJAN, A. T., *et al.*, ¹³⁷Cs-induced chromosome aberrations analyzed by fluorescence in situ hybridization: eight years follow up of the Goiânia radiation accident victims, *Mutat. Res.* **400** (1998) 299–312.
- [210] SAKAMOTO-HOJO, E.T., NATARAJAN, A.T., CURADO, M.P., Chromosome translocations in lymphocytes from individuals exposed to ¹³⁷Cs 7.5 years after the accident in Goiânia (Brazil), *Radiat. Prot. Dosim.* **86** (1999) 25–32.
- [211] BAUCHINGER, M., *et al.*, Collaborative exercise on the use of FISH chromosome painting for retrospective biodosimetry of Mayak nuclear-industrial personnel, *Int. J. Radiat. Biol.* **77** (2001) 259–267.

- [212] SALASSIDIS, K., *et al.*, Chromosome painting in highly irradiated Chernobyl victims: a follow-up study to evaluate the stability of symmetrical translocations and the influence of clonal aberrations for retrospective dose estimation, *Int. J. Radiat. Biol.* **68** (1995) 257–262.
- [213] LINDHOLM, C., TEKKELE, M., VEIDEBAUM, T., ILUS, T. SALOMAA, S., Persistence of translocations after accidental exposure to ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 565–571.
- [214] LINDHOLM, C., *et al.*, Intercomparison of translocation and dicentric frequencies between laboratories in a follow-up of the radiological accident in Estonia, *Int. J. Radiat. Biol.* **78** (2002) 883–890.
- [215] DURAN, A., *et al.*, Suitability of FISH painting techniques for the detection of partial-body irradiations for biological dosimetry, *Radiat. Res.* **157** (2002) 461–468.
- [216] GUERRERO-CARBAJAL, Y.C., MOQUET, J.E., EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., The persistence of FISH translocations for retrospective biological dosimetry after simulated whole or partial body irradiation, *Radiat. Prot. Dosim.* **76** (1998) 159–168.
- [217] SEVAN'KAEV, A.V., *et al.*, A cytogenetic follow-up of some highly irradiated victims of the Chernobyl accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **113** (2005) 152–161.
- [218] LINDHOLM, C., SALOMAA, S., Dose assessment of past accidental or chronic exposure using FISH chromosome painting, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 21–25.
- [219] MULLER, I., *et al.*, Time-course of radiation-induced chromosomal aberrations in tumor patients after radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **63** (2005) 1214–1220.
- [220] XUNCLA, M., *et al.*, Cytogenetic damage induced by radiotherapy. Evaluation of protection by amifostine and analysis of chromosome aberrations persistence, *Int. J. Radiat. Biol.* **84** (2008) 243–251.
- [221] SCHMIDBERGER, H., *et al.*, Reciprocal translocations in patients with testicular seminoma before and after radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **50** (2001) 857–864.
- [222] GEBHART, E., NEUBAUER, S., SCHMITT, G., BIRKENHAKE, S. and DUNST, J., Use of a three-colour chromosome in situ suppression technique for the detection of past radiation exposure, *Radiat. Res.* **145** (1996) 47–52.
- [223] PALA, F.S., MOQUET, J.E., EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., *In vitro* transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes, *Mutat. Res.* **474** (2001) 139–146.
- [224] GARDNER, S.N., TUCKER, J. D., The cellular lethality of radiation-induced radiation-induced chromosome translocations in human lymphocytes, *Radiat. Res.* **157** (2002) 539–552.
- [225] HANDE, M.P., NATARAJAN, A.T., Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X irradiation analysed by fluorescence in situ hybridization. IV. Dose response, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 441–448.
- [226] XIAO, Y., DARROUDI, F., GRIGOROVA, M., NATARAJAN, A.T., Induction and persistence of chromosomal exchanges in mouse bone marrow cells following whole-body exposure to X-rays, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 1119–1128.
- [227] ROMM, H., STEPHAN, G., Dose dependency of FISH-detected translocations in stable and unstable cells after Cs gamma irradiation of human lymphocytes *in vitro*, *Cytogenet. Genome Res.* **104** (2004) 162–167.
- [228] RODRIGUEZ, P., *et al.*, Analysis of translocations in stable cells and their implications in retrospective biological dosimetry, *Radiat. Res.* **162** (2004) 31–38.
- [229] BAUCHINGER, M., SCHMID, E., ZITZELBERGER, H., BRASELMANN, H., AHRSTEDT, U., Radiation-induced chromosomal aberrations analyzed by two colour fluorescence in situ hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe, *Int. J. Radiat. Biol.* **64** (1993) 179–84.

- [230] FERNANDEZ, J. L., *et al.*, X-ray biological dosimetry performed by selective painting of human chromosomes 1 and 2, *Int. J. Radiat. Biol.* **67** (1995) 295-302.
- [231] FINNON, P., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., Fluorescence in situ hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry, *Int. J. Radiat. Biol.* (1995) **68** 429–435.
- [232] HSIEH, W.A., *et al.*, Alpha coefficient of dose-response for chromosome translocations measured by FISH in human lymphocytes exposed to chronic ⁶⁰Co gamma rays at body temperature, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 435–439.
- [233] DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., Application of FISH chromosome painting assay for dose reconstruction: State of the art and current views, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 51–58.
- [234] SALISSIDIS, K., SCHMID, E., PETER, R.U., BRASELMANN, H., BAUCHINGER, M., Dicentric and translocation analysis for retrospective dose estimation in humans exposed to ionising radiation during the Chernobyl power plant accident, *Mutat. Res.* **311** (1994) 39–48.
- [235] LLOYD, D.C., *et al.*, “Retrospective dosimetry by chromosomal analysis”, *The Radiological Consequences of the Chernobyl Accident (Proc. Mtg Minsk, 1996)*, Rep. Eur 16544 EN, (1996) 965–973.
- [236] SNIGIRYOVA, G., BRASELMANN, H., SALASSIDIS, K., SHEVCHENKO, V., BAUCHINGER, M., Retrospective biodosimetry of Chernobyl clean-up workers using chromosome painting and conventional chromosome analysis, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 119–127.
- [237] DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., “Biological dosimetric studies in the Chernobyl radiation accident, on populations living in the contaminated areas (Gomel regions) and in Estonian clean-up workers, using FISH technique”, *The Radiological Consequences of the Chernobyl Accident (Proc. Mtg Minsk, 1996)* Eur 16544 EN, (1996) 1067–1072.
- [238] SALISSIDIS, K., *et al.*, Analysis of symmetrical translocations for retrospective biodosimetry in radiation workers of the Mayak nuclear-industrial complex (Southern Urals) using FISH-chromosome painting, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1999) 431–439.
- [239] BAUCHINGER, M., *et al.*, FISH-based analysis of stable translocations in a Techa river population, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 605–612.
- [240] TUCKER, J.D., *et al.*, Biological dosimetry of radiation workers at the Sellafield nuclear facility, *Radiat. Res.* **148** (1997) 216–226.
- [241] NAKAMURA, N., MIYAZAWA, C., SAWADA, S., AKIYAMA, M., AWA, A.A., A close correlation between spin resonance (ESR) dosimetry from tooth enamel and cytogenetic dosimetry from lymphocytes of Hiroshima atomic-bomb survivors, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 619–627.
- [242] LLOYD, D.C., MOQUET, J.E., ORAM, S., EDWARDS, A.A., LUCAS, J.N., Accidental intake of tritiated water: A cytogenetic follow-up case on translocation stability and dose reconstruction, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 543–547.
- [243] RAMALHO, A.T., NASCIMENTO, A.C.H., NATARAJAN, A.T., Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiânia (Brazil) radiation accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **25** (1988) 97–100.
- [244] STRAUME, T., *et al.*, Novel biodosimetry methods applied to victims of the Goiânia accident, *Health Phys.* **60** (1991) 71–76.
- [245] STEPHAN, G., PRESSL, S., Chromosome aberrations in human lymphocytes analysed by fluorescence in situ hybridization after *in vitro* irradiation, and in radiation workers, 11 years after an accidental radiation exposure, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 293–299.
- [246] LINDHOLM, C., *et al.*, Biodosimetry after accidental radiation exposure by conventional chromosome analysis and FISH, *Int. J. Radiat. Biol.* **70** (1996) 647–656.

- [247] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, The Radiological Accident in Lilo, IAEA, Vienna (2000).
- [248] ROY, L., *et al.*, Study of the tools available in biological dosimetry to estimate the dose in cases of accidental complex overexposure to ionizing radiation: the Lilo accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **82** (2006) 39–48.
- [249] DARROUDI, F., *et al.*, Detection of total and partial body irradiation in a monkey model: a comparative study of chromosomal aberration, micronuclei and premature chromosome condensation assays, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 207–215.
- [250] PRASANNA, P.G.S., KOLANKO, C.J., GERSTENBERG, H.M., BLAKELY, W.F., Premature chromosome condensation assay for biodosimetry: Studies with fission neutrons, *Health Phys.* **72** (1997) 594–600.
- [251] TERZOUDI, G.I., PANTELIAS G.E., Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualization after exposure to ionizing radiation, *Radiat. Prot. Dosim.* **122** (2006) 513–520.
- [252] DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., “Premature chromosome condensation, a novel method for biological dosimetry”, *High Levels of Natural Radiation (Proc. 10th Int. Congr. Vienna, 1993)*, IAEA, Vienna (1993) 479–485.
- [253] KANDA, R., MINAMIHISAMATSU, M., HAYATA, I., Dynamic analysis of chromosome aberrations in three victims of the Tokai-mura criticality accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **78** (2002) 857–862.
- [254] HAYATA, I., KANDA, R., MINAMIHISAMATSU, M., FURUKAWA, A., SASAKI, M.S., Cytogenetical dose estimation for 3 severely exposed cases in the JCO criticality accident in Tokai-mura, *J. Radiat. Res.* **42** Suppl. (2001) S149–S155.
- [255] ISHIGURE, N., ENDO, A., YAMAGUCHI, Y., KAWACHI, K., Calculation of the absorbed dose for the overexposed patients at the JCO criticality accident in Tokai-mura, *J. Rad. Res.* **42** Suppl. (2000) S137–S148.
- [256] BAUCHINGER, M., BRASELMANN, H., “Use of micronuclei in biological dosimetry of absorbed radiation dose”, *Chromosome Aberrations — Basic and Applied Aspects*, Springer-Verlag, Berlin (1989) 202–211.
- [257] KOTELES, G.J., The human lymphocyte micronucleus assay. A review on its applicabilities in occupational and environmental medicine, *Centr. Europ. J. Occup. Environ. Med.* **2** (1996) 12–30.
- [258] FENECH, M., The *in vitro* micronucleus technique, *Mutat. Res.* **455** (2000) 81–95.
- [259] FENECH, M., PEREPETSKAYA, G., MIKHALEVICH, L., A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations — Experiences from the Chernobyl catastrophe, *Environ. Mol. Mutagen.* **30** (1997) 112–118.
- [260] MIKHALEVICH, L.S., *et al.*, Radiation effects in lymphocytes of children living in a Chernobyl contaminated region of Belarus, *Int. J. Radiat. Biol.* **76** (2000) 1377–1385.
- [261] FUCIC, A., *et al.*, Genomic damage in children accidentally exposed to ionizing radiation: A review of the literature, *Mutat. Res.* **658** (2008) 111–123.
- [262] KIRSCH-VOLDERS, M., FENECH, M., Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes, *Mutagenesis* **16** (2001) 51–58.
- [263] ROSEFORT, C., FAUTH, E., ZANKL, H., Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay, *Mutagenesis* **19** (2004) 277–284.
- [264] NORPPA, H., RENZI, L., LINDHOLM, C., Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-block human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis* **8** (1993) 519–525.

- [265] HUBER, R., *et al.*, Detection of centromeres in vinblastine- and radiation-induced micronuclei of human lymphocytes using FISH with an alpha satellite pancentromeric DNA probe, *Environ. Mol. Mutagen.* **27** (1996) 105–109.
- [266] THIERENS, H., *et al.*, Scoring of different cytogenetic endpoints after *in vitro* low dose γ -exposure: interlaboratory comparison for biomonitoring of radiological workers, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 23–34.
- [267] PALA, F.S., *et al.*, The effects of micronuclei with whole chromosomes on biological dose estimation, *Turk. J. Biol.* **32** (2008) 283–290.
- [268] MUELLER, W.U., RODE, A., The micronucleus assay in human lymphocytes after high radiation doses (5-15 Gy), *Mutat. Res.* **502** (2002) 47–51.
- [269] ABRAMSSON-ZETTERBERG, L., ZETTERBERG, G., BERGQVIST, M., GRAWE, J., Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in transferring-positive immature peripheral blood reticulocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* **36** (2000) 22–31.
- [270] STOPPER, H., *et al.*, Pilot study for comparison of reticulocyte-micronuclei with lymphocyte-micronuclei in human biomonitoring, *Toxicol. Lett.* **156** (2005) 351–360.
- [271] GRAWE, J., Evaluation of the reticulocyte micronucleus assay in patients treated with radioiodine for thyroid cancer, *Mutat. Res.* **583** (2005) 12–25.
- [272] VRAL, A., Micronuclei induced by fast neutrons versus ^{60}Co γ -rays in human peripheral blood lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **65** (1994) 321–328.
- [273] VERHAEGEN, F., VRAL, A., Sensitivity of micronucleus induction in human lymphocytes to low LET radiation qualities: RBE and correlation of RBE and LET, *Radiat. Res.* **139** (1994) 208–213.
- [274] WUTTKE, K., MULLER, W.U., STREFFER, C., The sensitivity of the *in vitro* cytokinesis-block micronucleus assay in lymphocytes for different and combined radiation qualities, *Strahlentherapie Onkol.* **174** (1998) 262–268.
- [275] GERSEY, B., *et al.*, Micronuclei induction in human fibroblasts exposed *in vitro* to Los Alamos high-energy neutrons, *Adv. Space Res.* **40** (2007) 1754–1757.
- [276] FENECH, M., AITKEN, C., RINALDI, J., Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults, *Carcinogenesis* **19** (1998) 1163–1171.
- [277] FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W.P., ZEIGER, E., BONASSI, S., The HUMN Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, *Mutat. Res.* **428** (1999) 271–283.
- [278] THIERENS, H., VRAL, A., DE RIDDER, L., A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency, *Mutat. Res.* **360** (1996) 75–82.
- [279] THIERENS, H., *et al.*, Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus-centromere assay, *Mutagenesis* **15** (2000) 245–249.
- [280] THIERENS, H., *et al.*, A cytogenetic study of nuclear power plant workers using the micronucleus-centromere assay, *Mutat. Res.* **445** (1999) 105–111.
- [281] CATALAN, J., *et al.*, Age-dependent inclusion of sex chromosomes in lymphocyte micronuclei of man, *Am. J. Hum. Genet.* **63** (1998) 1464–1472.
- [282] CARERE, A., ANTOCCIA, A., CIMINI, D., *et al.*, Analysis of chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-block lymphocytes of 24 male subjects, *Mutagenesis* **14** (1999) 491–496.
- [283] THIERENS, H., VRAL, A., DERIDDER, L., Biological dosimetry using the micronucleus assay for lymphocytes: interindividual differences in dose-response, *Hlth Phys.* **61** (1991) 623–630.

- [284] EASTMOND, D.A., TUCKER, J.D., Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-block human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.* **13** (1989) 34–43.
- [285] LEE, T.K., *et al.*, Micronuclei in lymphocytes of prostate cancer patients undergoing radiation therapy, *Mutat. Res.* **469** (2000) 63–70.
- [286] THIERENS, H., VRAL, A., VAN EIJKEREN, M., SPELEMAN, F., DE RIDDER, L., Micronucleus induction in peripheral blood lymphocytes of patients under radiotherapy treatment for cervical cancer or Hodgkin's disease, *Int. J. Radiat. Biol.*, **67** (1995) 529–539.
- [287] SILVA-BARBOSA, I., PEREIRA-MAGNATA, S., AMARAL, A., SOTERO, G., MELO, H.C., Dose assessment by quantification of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes from patients exposed to gamma radiation, *Genet. Mol. Biol.* **28** (2005) 452–457.
- [288] LE ROUX, J., SLABBERT, J., SMIT, B., BLEKKENHORST, G., Assessment of the micronucleus assay as a biological dosimeter using cytokinesis-block lymphocytes from cancer patients receiving fractionated partial-body radiotherapy, *Strahlenther. Onkol.* **174** (1998) 75–81.
- [289] IARMARCOVAI, G., *et al.*, Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis, *Mutat. Res.* **659** (2008) 274–283.
- [290] MONSIEURS, M., *et al.*, Patient dosimetry after ¹³¹I lipiodol therapy, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **30** (2003) 554–561.
- [291] LIVINGSTON, G.K., FOSTER, A.E., ELSON, H.R., Effect of in vivo exposure to iodine-131 on the frequency and persistence of micronuclei in human lymphocytes, *J. Toxicol. Environ. Hlth* **40** (1993) 367–375.
- [292] FENECH, M., *et al.*, Micronuclei in cytokinesis-block lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy, *Int. J. Radiat. Biol.* **57** (1990) 373–383.
- [293] DIAS, F.L., *et al.*, Cytogenetic analysis in lymphocytes from workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **23** (2007) 228–233.
- [294] SARI-MINODIER, I., *et al.*, Cytogenetic monitoring by use of the micronucleus assay among hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation, *Mutat. Res.* **629** (2007) 111–121.
- [295] THIERENS, H., *et al.*, Micronucleus assay reveals no radiation effects among nuclear power plant workers, *Hlth Phys.* **83** (2002) 178–182.
- [296] VAGLENOV, A., *et al.*, Cytogenetic monitoring of workers from a nuclear power plant, *Centr. Eur. J. Occupation. Environ. Med.* **3** (1997) 40–47.
- [297] LIVINGSTON, G.K., *et al.*, Radiobiological evaluation of immigrants from the vicinity of Chernobyl, *Int. J. Radiat. Biol.* **72** (1997) 703–713.
- [298] TANAKA, K., *et al.*, Unstable-type chromosome aberrations in lymphocytes from individuals living near Semipalatinsk Test Site, *J. Radiat. Res.* **47** (2006) Suppl. A159–A164.
- [299] THIERENS, H., *et al.*, Cytogenetic biodosimetry of an accidental exposure of a radiological worker using multiple assays, *Radiat. Prot. Dosim.* **113** (2005) 408–414.
- [300] MARTIN, P.R., BERDYCHEVSKI, R.E., SUBRAMANIAN, U., BLAKELY, W.F., PRASANNA, P.G.S., Sample tracking in an automated cytogenetic biodosimetry laboratory for radiation mass casualties, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1119–1124.
- [301] FRIEDMAN, L.I., SEVERNS, M.L., Application of robotics in blood banking, *Vox Sang* **51** Suppl. 1 (1986) S57–S62.
- [302] HANSON, K.L., CARTWRIGHT, C.P., Evaluation of an automated liquid-handling system (Tecan Genesis RSP 100) in the Abbott LCx assay for *Chlamydia trachomatis*, *J. Clin. Microbiol.* **39** (2001) 1975–1977.

- [303] DENG, W., TSAO, S.W., LUCAS, J.N., LEUNG, C.S., CHANG, A.L., A new method for improving metaphase chromosome spreading, *Cytometry* **51** (2003) 46–51.
- [304] WEBER, J., SCHEID, W., TRAUT, H., Time saving in biological dosimetry by using the automatic metaphase finder, *Metafer2. Mutat. Res.* **272** (1992) 31–34.
- [305] LLOYD, D.C., “Advances in cytogenetic dosimetry”, *The Medical Basis of Radiation Accident Preparedness II: Clinical Experience and Follow Ups since 1979*, (RICKS, R. E., FRY, S. S. E., Eds), Elsevier, New York, NY (1990) 479-487.
- [306] FINNON, P., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., An assessment of the metaphase finding capability of the Cytoscan 110, *Mutation Res.* **164** (1986) 101–108.
- [307] LLOYD, D.C., “Automated aberration scoring: the requirements of an end-user”, *Automation of Cytogenetics* (LUNDSTEEN, C., PIPER, J., Eds), Springer-Verlag, Heidelberg (1989). 9–17.
- [308] LORCH, T., WITTLER, C., STEPHAN, G., BILLE, J., “An automated chromosome aberration scoring system”, *Automation of Cytogenetics* (LUNDSTEEN, C., PIPER, J., Eds), Springer- Verlag, Heidelberg (1989) 19–30.
- [309] FINNON, P., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., “Progress in automatic dicentric hunting”, *Chromosome Alterations, Origin and Significance* (OBE, G., NATARAJAN, A.T., Eds), Springer-Verlag, Heidelberg (1994) 192–202.
- [310] STEPHAN, G., “Automatische Analyse dizentrischer Chromosomen”, *Methodische Fragen beim Human Population Monitoring in der Zytogenetik* (ARNDT, D., OBE, G., Eds), MMV Verlag, München (1996).
- [311] VAURIJOUX, A., *et al.*, Strategy for Population Triage Based on Dicentric Analysis, *Radiat. Res.* **171** (2009) 541–548.
- [312] CASTELAIN, P., *et al.*, Automated detection of cytochalasin-B blocked binucleated lymphocytes for scoring micronuclei, *Mutagenesis* **8** (1993) 285–293.
- [313] VERHAEGEN, F., *et al.*, Scoring of radiation-induced micronuclei in cytokinesis-block human lymphocytes by automated image analysis, *Cytometry* **17** (1994) 119–127.
- [314] SCHUNK, C., *et al.*, New developments in automated cytogenetic imaging: unattended scoring of dicentric chromosomes, micronuclei, single cell gel electrophoresis, and fluorescence signals, *Cytogenet. Genome Res.* **104** (2004) 383–389.
- [315] VARGA, D., *et al.*, An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis, *Mutagenesis* **19** (2004) 391–397.
- [316] DECORDER, I., *et al.*, Automated image analysis of cytokinesis-block micronuclei: an adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring, *Mutagenesis* **24** (2009) 85–93.
- [317] KORTHOFF, K., CAROTHERS, A.D., Test of performance of four semi-automatic metaphase-finding and karyotyping systems, *Clin. Gen.* **40** (1991) 441-451.
- [318] VROLIK, J., SLOOS, W.C., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., TANKE, H.J., A system for fluorescence metaphase finding and scoring of chromosomal translocations visualized by in situ hybridisation, *Int. J. Radiat. Biol.* **66** (1994) 287–295.
- [319] WU, Q., SNELLINGS, J., AMORY, L., SUETENS, P., OOSTERIJNCK, A., “Model-based contour analysis in a chromosome segmentation system”, *Automation of Cytogenetics*, Springer, Heidelberg (1989) 217–229.
- [320] PIPER, J., *et al.*, Automated fluorescence metaphase finder speeds translocation scoring in FISH painted chromosomes, *Cytometry* **16** (1994) 7–16.
- [321] MASCIU, L.N., *et al.*, Advances in the automated detection of metaphase chromosomes labelled with fluorescence dyes, *Cytometry* **33** (1998) 10–18.
- [322] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Generic procedures for medical response during a nuclear or radiological emergency, *EPR-MEDICAL IAEA*, Vienna (2005).

- [323] ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA, Manual para Primeros Actuantes ante Emergencias Radiológicas, EPR-PRIMEROS ACTUANTES (2007), OIEA, Viena (2007).
- [324] NATIONAL COUNCIL OF RADIATION PROTECTION AND MEASUREMENTS, Key elements of preparing emergency responders for nuclear and radiological terrorism, Commentary No. 19, Bethesda, MD (2005).
- [325] WASELENKO, J.K., *et al.*, Medical management of the acute radiation syndrome: Recommendations of the Strategic National Stockpile Working Group, *Ann. Intern. Med.* **140** (2004) 1037–1051.
- [326] ALEXANDER, G.A., *et al.*, BiodosEPR-2006 Meeting: Acute dosimetry consensus committee recommendations on biodosimetry applications in events involving uses of radiation by terrorists and radiation accidents, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 972–996.
- [327] FLYNN, D.F., GOANS, R.E., Nuclear terrorism: triage and medical management of radiation and combined-injury casualties, *Surg. Clin. N. Am.* **86** (2006) 601-636.
- [328] BLAKELY, W.F., WALTER, C.A., PRASANNA, P.G.S., Early-response biological dosimetry—recommended countermeasure enhancements for mass casualty radiological incidents and terrorism, *Hlth Phys.* **89** (2005) 494–504.
- [329] BLAKELY, W.F., Early Biodosimetry Response: Recommendations for Mass-Casualty Radiation Accidents and Terrorism (Refresher Course for the 12th International Congress of the International Radiation Protection Association, Buenos Aires, 19–24 October 2008), http://www.irpa12.org.ar/PDF/RC/RC_12_fullpaper.pdf
- [330] MURATA, H., AKASHI, M., The report of the criticality accident in a uranium conversion test plant in Tokai-mura, NIRS-M-154, National Institute of Radiation Sciences, Japan (2002).
- [331] US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Radiation Event Medical Management, <http://www.remm.nlm.gov/>
- [332] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., MOQUET, J.E., GUERRERO-CARBAJAL, Y.C., The role of cytogenetics in early triage of radiation casualties, *Appl. Radiat. Isot.* **52** (2000) 1107–1112.
- [333] VOISIN, P., *et al.*, The cytogenetic dosimetry of recent accidental overexposure, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* **47** (2001) 557–564.
- [334] FLEGAL, F.N., DEVANTIER, Y., MCNAMEE, J.P., WILKINS, R.C., QuickScan dicentric chromosome analysis for radiation biodosimetry, *Hlth Phys.* **98** (2010) 276–281.
- [335] LINDHOLM, C., *et al.*, Premature chromosome condensation (PCC) assay for dose assessment in mass casualty accidents, *Radiat. Res.* **173** (2010) 71–78.
- [336] MCNAMEE, J.P., FLEGAL, F.N., BOULAY GREENE, H., MARRO, L., WILKINS R.C., Validation of the Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN) assay for use as a triage biological dosimetry tool, *Radiat. Prot. Dosim.* **135** (2009) 232–242.
- [337] YOSHIDA, M.A., *et al.*, The Chromosome Network for biodosimetry in Japan, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1125–1127.
- [338] MILLER, S. M., *et al.*, Canadian Cytogenetic Emergency Network (CEN) for biological dosimetry following radiological/nuclear accidents, *Int. J. Radiat. Biol.* **83** (2007) 471–477.
- [339] WOJCIK, A., LLOYD, D., ROMM, H., ROY, L., Biological dosimetry for triage of casualties in a large-scale radiological emergency: Capacity of the EU member states, *Radiat. Prot. Dosim.* **138** (2010) 397–401.
- [340] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, RANET Assistance Action Plan – Arrangements for Providing International Assistance and Sample of Assistance Action Plan, IAEA, Vienna, Austria, 2006.

- [341] BLAKELY, W.F., *et al.*, WHO 1st consultation on the development of a global biodosimetry laboratories network for radiation emergencies (BioDoseNet), *Radiat. Res.* **171** (2009) 127–39.
- [342] SEVAN'KAEV, A.V., Results of cytogenetic studies of the consequences of the Chernobyl accident, *Radiats. Biol. Radioecol.* **40** (2000) 589–595.
- [343] MAZNIK, N.A., VINNIKOV, V.A., LLOYD, D.C., EDWARDS, A. A., Chromosomal dosimetry for some groups of evacuees from Prypiat and Ukrainian liquidators, *Radiat. Prot. Dosim.* **74** (1997) 5–11.
- [344] SHEVCHENKO, V.A., SNIGIRYOVA, G.P., “Cytogenetic effects of the action of ionizing radiations on human population”, Research Activities about the Radiological Consequences of the Chernobyl NPS Accident and Social Activities to Assist the Sufferers by the Accident (IMANAKA, T., Ed.), Research Reactor Institute, Kyoto University (1998) 203–215.
- [345] SEVAN'KAEV, A.V., *et al.*, A survey of chromosomal aberrations in lymphocytes of Chernobyl liquidators, *Radiat. Prot. Dosim.* **58** (1995) 85–91.
- [346] MAZNIK, N.A., VINNIKOV, V.A., The retrospective cytogenetic dosimetry using the results of conventional chromosomal analysis in Chernobyl clean-up workers, *Radiat. Biol. Radioecol.* **45** (2005) 700–708.
- [347] SEVAN'KAEV, A.V., *et al.*, Novel data set for retrospective biodosimetry using both conventional and FISH chromosome analysis after high accidental overexposure, *Appl. Radiat. Isot.* **52** (2000) 1149–1152.
- [348] EDWARDS, A., *et al.*, Biological estimates of dose to inhabitants of Belarus and Ukraine following the Chernobyl accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **111** (2004) 211–219.
- [349] KOKSAL, G., PALA, F.S., DALCI, D.O., *In vitro* dose-response curve for chromosome aberrations induced in human lymphocytes by ⁶⁰Co gamma-radiation, *Mutat. Res.* **329** (1995) 57–61.
- [350] RAMALHO, A.T., NASCIMENTO, A.C., The fate of chromosomal aberrations in ¹³⁷Cs-exposed individuals in the Goiânia radiation accident, *Health Phys.* **60** (1991) 67–70.
- [351] SASAKI, M.S., HAYATA, I., KAMADA, N., KODAMA, Y., KODAMA, S., Chromosome aberration analysis in persons exposed to low-level radiation from the JCO criticality accident in Tokai-mura, *J. Radiat. Res.* **42** Suppl. (2001) S107-S116.
- [352] JINARATANA, V., *The Radiological Accident in Thailand*, Parthenon Publishing, (2002) 283–301.
- [353] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *The Radiological Accident in Nueva Aldea*, IAEA, Vienna (2009).
- [354] BERTHO, J.M., ROY, L., A rapid multiparametric method for victim triage in cases of accidental protracted irradiation or delayed analysis, *Br. J. Rad.* **82** (2009) 764–770.
- [355] WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Biorisk Management: Laboratory Biosecurity Guidance*, WHO, Geneva (2006).
- [356] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, *Manual de bioseguridad en el laboratorio – 3ª ed.*, OMS, Ginebra (2005).
- [357] ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA, *Glosario de Seguridad Tecnológica del OIEA – Terminología empleada en seguridad tecnológica nuclear y protección radiológica*, Edición de 2007, OIEA, Viena (2008).

Anexo I

PRUEBA DE DICÉNTRICOS

Se ha descrito y examinado ya la variedad de materiales y métodos de obtención y procesamiento de cultivos de linfocitos utilizados comúnmente en los laboratorios de todo el mundo, y probablemente no haya dos laboratorios que apliquen exactamente la misma técnica. En el presente anexo se ofrece una descripción detallada paso a paso de un método fiable que puede ser de ayuda para algunos laboratorios.

I-1. CULTIVO DE LINFOCITOS

I-1.1. Material

- 1) Sangre entera heparinizada.
- 2) Fitohemaglutinina (PHA), disponible en el comercio. Si se ha obtenido liofilizada se deberá reconstituir con agua esterilizada de calidad analítica.
- 3) Medio de cultivo mínimo esencial de Eagle (MEM), disponible en el comercio: listo para usar, concentrado x10 o en polvo. Las concentraciones de trabajo se deben preparar con agua esterilizada de calidad analítica. Quizá sea necesario agregar L-glutamina, de conformidad con las instrucciones del fabricante. Hay que ajustar el pH con bicarbonato sódico estéril.
 - i) Puede que sea necesario agregar antibióticos al medio obtenido a partir de un concentrado. Agregar 1 mL de una solución madre de antibiótico en solución salina a 100 mL de medio. La solución madre deberá contener 100 UI/mL de bencilpenicilina y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina y se puede conservar congelada.
- 4) Bromodesoxiuridina (BrdU). Agregar 1 mL de una solución madre a 100 mL de medio. La solución madre contiene 6,4 mg de BrdU disueltos en 10 mL de medio y se filtra por membrana. Se obtiene así una concentración final en el cultivo de 15 µM. La solución se puede conservar durante un mes a oscuras y a 4 °C o durante varios meses a -20 °C.
- 5) Suero de ternera fetal termoinactivado (56 °C durante 0,5 horas), disponible en el comercio y conservado congelado.
- 6) Colcemid: solución madre de 10 µg/mL en suero fisiológico estéril. Se puede conservar a 4 °C durante 6 meses.
- 7) Recipientes de cultivo estériles. Existen diversas opciones, por ejemplo, botellas de vidrio para bacteriología o recipientes de plástico desechables. Deben tener un volumen de 15 a 20 mL.
- 8) Hay que sembrar los cultivos en campanas de seguridad microbiológica de clase II, con luz atenuada. Se pueden transferir los líquidos de un recipiente a otro utilizando jeringas o pipetas estériles desechables. Si hay que pasar la sangre a través de una aguja hipodérmica, habrá que hacerlo despacio, utilizando una aguja de gran calibre (por ejemplo, 19), para ejercer el mínimo de tensión en las células.

I-1.2. Método

- 1) Colocar 0,3 mL de sangre heparinizada en un recipiente de cultivo.
- 2) Agregar 4,0 mL de medio de cultivo al que ya se habrán añadido antibióticos y BrdU.
- 3) Agregar 0,1 mL de PHA reconstituida.

- 4) Agregar 0,5 mL de suero de ternera fetal.
- 5) Cerrar el tapón firmemente.
- 6) Mezclar el contenido agitando suavemente.
- 7) Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a oscuras durante 45 horas.
- 8) Agregar al cultivo 50 μL de solución madre de Colcemid y agitar suavemente.
- 9) Incubar de nuevo durante otras tres horas.

I-2. FIJACIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS

I-2.1. Método

- 1) Verter el contenido del recipiente de cultivo en un tubo de centrifuga.
- 2) Centrifugar a 200g durante 10 min (para transformar las g en rev/min, utilícese $g = r\omega^2/981$, donde r = el radio en cm y $\omega = (2\pi \times \text{rev/min})/60$).
- 3) Retirar el sobrenadante por succión y suspender de nuevo el sedimento de células en 5 a 10 mL de solución de cloruro potásico 0,075M.
- 4) Dejar en reposo a temperatura ambiente durante 15 a 20 min.
- 5) Volver a centrifugar a 200g durante 10 min.
- 6) Retirar el sobrenadante y suspender de nuevo las células en 5 a 10 mL de fijador de metanol/ácido acético 3:1 recién preparado. Hay que agregar el fijador lentamente pero a un ritmo constante, agitando vigorosamente, preferentemente con una mezcladora vorticial para que el fondo de células no se endurezca. Para impedir que las células se apelmacen también es útil mezclar suavemente el fondo de células antes de agregar el fijador sirviéndose del extremo de goma de una pipeta de Pasteur.
- 7) Volver a centrifugar.
- 8) Eliminar el sobrenadante y volver a suspender en 5 a 10 mL de fijador.
- 9) Volver a centrifugar.
- 10) Eliminar el sobrenadante y volver a suspender en 5 a 10 mL de fijador.
- 11) Volver a centrifugar.
- 12) Eliminar el sobrenadante salvo 0,25 mL y volver a suspender el precipitado de células en el líquido restante.
- 13) Cargar la suspensión de células en una pipeta de Pasteur.
- 14) Tomar un portaobjetos limpio, sin grasa, que se habrá mantenido en el congelador. Fundir la escarcha del portaobjetos con el aliento.
- 15) Verter una o dos gotas de la suspensión de células en el portaobjetos desde una altura mínima de 10 cm.
- 16) Obtener por lo menos dos preparaciones a partir de cada cultivo.
- 17) Colocar los portaobjetos a secar sobre una placa con calor suave.

I-3. TINCIÓN

I-3.1. Material

- 1) Colorante 33258. La solución madre concentrada 1 000 x de 50 µg/mL en tampón fosfato de pH 6,8 se puede conservar a 4 °C a oscuras.
- 2) Tinción de Giemsa.
- 3) Tampón fosfato (pH 6,8) preparado a partir de pastillas comerciales.
- 4) SSC 2 x (cloruro sódico y citrato sódico): 17,53 g de cloruro sódico, 8,82 g de citrato sódico, agua destilada para preparar 1,0 L.
- 5) Xileno y medio de montaje DPX.
- 6) Lámpara ultravioleta (>310 nm) o barra luminosa fluorescente.

I-3.2. Métodos

Hay que mantener las preparaciones a temperatura ambiente unos pocos días (hasta cinco) entre la preparación de los portaobjetos y el inicio de la tinción FPG, mientras que la tinción convencional con Giemsa se puede utilizar en cuanto las preparaciones se han secado. Una opción alternativa es secar las preparaciones a 37 °C y realizar la tinción FPG el día siguiente.

Fluorescencia más Giemsa (FPG)

- 1) Verter en el portaobjetos aproximadamente 10 gotas de colorante de Hoechst (diluido a partir de la solución madre a 0,5 µg/mL) y cubrir con un cubreobjetos.
- 2) Colocar la preparación sobre una hoja de aluminio y bajo una lámpara ultravioleta durante 0,5 horas.
- 3) Retirar cuidadosamente el cubreobjetos.
- 4) Lavar abundantemente con un tampón de pH 6,8.
- 5) Colocar en SSC 2 x a 60 °C durante 20 a 30 min.
- 6) Lavar con agua destilada.
- 7) Colocar las preparaciones en colorante de Giemsa — solución de 5 a 10 % en tampón de pH 6,8 durante 3 min.
- 8) Aclarar brevemente en tampón.
- 9) Aclarar brevemente en agua destilada.
- 10) Dejar secar al aire.
- 11) Aclarar y montar tapando con un cubreobjetos.

Giemsa convencional

- 1) Colocar la preparación en colorante de Giemsa al 2 % en tampón de pH 6,8 durante 5 min.
- 2) Lavar con tampón.
- 3) Aclarar brevemente en agua destilada.
- 4) Dejar secar al aire.
- 5) Aclarar y montar tapando con un cubreobjetos.

Anexo II

PRUEBA DE TRASLOCACIONES CON FISH

En el procedimiento expuesto aquí se utilizan sondas marcadas directamente y sondas marcadas indirectamente (disponibles en el comercio) y se describe el pintado de tres parejas de cromosomas con colores distintos, todos los centrómeros con un cuarto color, y contrateñido de los cromosomas restantes. Los fabricantes facilitan protocolos que se pueden leer conjuntamente con el método expuesto a continuación.

II-1.1. Pretratamiento

Lavar los portaobjetos con PBS durante 5 min a temperatura ambiente. Deshidratar los portaobjetos en una serie de diluciones de etanol (70, 90 y 100 %) de 2 a 5 min en cada paso, a temperatura ambiente, y secar al aire.

II-1.2. Tratamiento con ARNasa y pepsina

Mezclar 445 μL de agua, 50 μL 20 x SSC y 5 μL de ARNasa A (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (la mezcla se puede preparar por adelantado, conservándola a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pipetear 100 μL de ARNasa A por preparación, cubrir con un portaobjetos. Incubar en una cámara de humedad durante 60 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Lavar tres veces con SSC 2 x (5 min cada vez a temperatura ambiente). Durante el primer lavado, retirar el cubreobjetos. Seguidamente, lavar con PBS durante 5 min a temperatura ambiente. Para el tratamiento con pepsina (0,005 % en HCl 10 mM), preparar por adelantado una mezcla de 50 μL de pepsina (10 %), 99 mL de agua y 1 mL de HCl 1N. La mezcla se puede conservar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Precalentar la mezcla al baño María a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y verter 100 μL en cada portaobjetos durante 1 o 2 min. Lavar con PBS durante 5 min a temperatura ambiente.

Lavar con MgCl_2 -PBS 50 mM (5mL de MgCl_2 y 95 mL de PBS) durante 5 min a temperatura ambiente. Lavar con formaldehído al 1 % en MgCl_2 -PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Aclarar en PBS durante 5 min a temperatura ambiente. Deshidratar en una serie de diluciones de etanol (70, 90 y 100 %), de 2 a 5 min en cada una, a temperatura ambiente, y dejar secar al aire.

II-1.3. Protocolo FISH para sondas de pintado cromosómico en combinación con una sonda pancentromérica

Calentar las sondas de pintado cromosómico a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ y agitarlas antes de utilizarlas. Colocar en un tubo de Eppendorf con tampón de hibridación una cantidad suficiente de cada pintura cromosómica; agitar bien y centrifugar.

a) *Desnaturalización*

Las pinturas cromosómicas se pueden desnaturalizar incubando a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min en un baño María. Seguidamente, poner en hielo 2 o 3 min y transferir a un baño María ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) e incubar durante 60 min.

Si las pinturas cromosómicas se utilizan junto con una sonda pancentromérica (CP), calentar primero la CP y el tampón de hibridación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min antes de la hibridación competitiva de las sondas. Desnaturalizar la CP por incubación a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min al baño María, y poner en hielo inmediatamente durante 2 o 3 min.

Para una coloración FISH triple con sonda pancentromérica hay que utilizar un volumen final de 18 a 20 μL de la mezcla de hibridación por preparación (es decir, para 3 μL de cada una de las sondas de pintado concentradas agregar 1,6 μL del tampón apropiado y añadir 2 a 3 μL de CP concentrada).

Por ejemplo, si se pintan tres cromosomas, los N^{os} 1, 4 y 8: cromosoma N^o 1 (biotina), N^o 4 biotina/FITC, N^o 8 FITC y CP FITC, darán, respectivamente, una señal de color rojo, amarillo, verde y verde.

b) Prehibridación

La prehibridación de las preparaciones debe comenzar unos 30 min antes del final de la hibridación competitiva. Poner 100 µL de formamida al 70 % en SSC 2 x y PBS 50 mM en cada portaobjetos y tapar con un cubreobjetos (350 µL de formamida 100 % desionizada (conservar a -20 °C), 50 µL de PBS 0,5 M (conservar a -20 °C) y 50 µL de SSC 20 x). La formamida se debe desionizar poco antes de su uso.

Desnaturalizar las preparaciones a 70 °C durante 2,5 min en una placa calefactora. Deshidratar las preparaciones en una serie de etanol (conservado a -20 °C) al 70 % durante 5 min, al 90 y al 100 % durante 2 a 5 min cada uno, a temperatura ambiente. Dejar que las preparaciones se sequen al aire.

c) Hibridación

Mezclar bien todas las pinturas cromosómicas y la CP en un tubo de Eppendorf. Centrifugar durante unos pocos segundos y colocar 20 µL de la mezcla en cada portaobjetos, tapar con un cubreobjetos, sellar con adhesivo y secar al aire. Seguidamente hay que incubar las preparaciones durante una noche en una cámara de humedad a 42 °C, lo que se puede prolongar hasta dos días.

Detección:

- 1) Preparar una solución de lavado (WS) de SSC 4 x que contenga un 0,05 % de Tween 20.
- 2) Diluir la proteína de bloqueo (BP) al 15 % (v/v) en WS.
- 3) Utilizar la BP de bloqueo para diluir los anticuerpos del modo siguiente:
 - 3.1.1 Primera capa, B3 (1:500), rojo Texas avidina.
 - 3.1.2 Segunda capa B4 (1:250) anti-avidina biotinilada de cabra.
 - 3.1.3 F1 (1:200) anti-FITC de conejo.
 - 3.1.4 Tercera capa, B3 (1:500) F2-FITC, IgG anti-conejo de cabra.
 - 3.1.5 F2 (1:100).
- 4) Incubar a oscuras durante 10 min a temperatura ambiente, microcentrifugar a 11 000 g durante 10 min, y utilizar el sobrenadante.
- 5) Precalear a 42 °C las soluciones siguientes:
 - i) La solución de lavado.
 - ii) Algo de SSC 2 x.
 - iii) Formamida al 50 % en SSC 2 x.
 - iv) SSC 0,1 %.
- 6) Retirar cuidadosamente los cubreobjetos en un recipiente con SSC 2 x precalentado.
- 7) Lavar los portaobjetos en las soluciones precalentadas del modo siguiente:
 - i) La solución de lavado.
 - ii) Algo de SSC 2 x.
 - iii) Formamida al 50 % en SSC 2 x.

- 8) Colocar 100 μL de la proteína de bloqueo diluida en cada portaobjetos y tapar con cubreobjetos, incubar en una cámara de humedad durante 15 a 20 min a 37 °C.
- 9) Lavar los portaobjetos con Tween 20 al 0,05 % en SSC 4 x de 2 a 5 min a 42 °C.
- 10) Colocar 100 μL de la primera capa de anticuerpos en cada portaobjetos y tapar con cubreobjetos. Incubar en una cámara de humedad durante 20 a 30 min a 37 °C.
- 11) Lavar tres veces los portaobjetos con Tween 20 al 0,05 % en SSC 4 x, durante 5 min cada vez, a 42 °C.
- 12) Colocar 100 μL de la segunda capa de anticuerpos en cada portaobjetos y tapar con cubreobjetos. Incubar en una cámara de humedad durante 20 a 30 min a 37 °C.
- 13) Lavar tres veces los portaobjetos con Tween 20 al 0,05 % en SSC 4 x, durante 5 min cada vez, a 42 °C.
- 14) Colocar 100 μL de la tercera capa de anticuerpos en cada portaobjetos y tapar con cubreobjetos, incubar en una cámara de humedad durante 20 a 30 min a 37 °C.
- 15) Lavar tres veces los portaobjetos con Tween 20 al 0,05 % en SSC 4 x, durante 5 min cada vez, a 42 °C.
- 16) Deshidratar las preparaciones en una serie de diluciones de etanol (70, 90 y 100 %), de 2 a 5 min en cada una, a temperatura ambiente.
- 17) Dejar que las preparaciones se sequen al aire.
- 18) Contrateñir con DAPI (0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio de montaje Vectashield), 25 μL por preparación bajo cubreobjetos.

Si las señales de pintado no son suficientemente intensas, se puede interponer después del paso 15 otra ronda de las capas 2 y 3 repitiendo los pasos 12 a 15. Otra opción, si solo uno de los colores es poco intenso, es repetir los pasos B3 / lavado / B4 para el rojo Texas o F1 / lavado / F2 para FITC.

Anexo III

CONDENSACIÓN PREMATURA DE CROMOSOMAS

III-1. PCC POR FUSIÓN MITÓTICA

Se fusionan células mononucleares de sangre periférica humana con células mitóticas de ovario de hámster chino (CHO) en presencia de macrogol (PEG). Como consecuencia de la fusión celular, en solo una hora, en las células sanguíneas mononucleares se condensa la cromatina; inmediatamente se disuelve la membrana nuclear y la cromatina se condensa aún más, formándose 46 ($2n = 46$) cromosomas monocromatídicos.

III-1.1. Aislamiento de linfocitos humanos de sangre periférica

Para separar las células mononucleares de la sangre entera anticoagulada se puede utilizar un tubo LeucoPREP o Ficoll-Hypaque de separación celular.

A. LeucoPREP

LeucoPREP es un sistema de tubos que contiene un medio de separación que, igual que el Ficoll-Hypaque, aprovecha la menor densidad de las células mononucleares y las plaquetas para separarlas del resto de componentes de la sangre entera anticoagulada. La separación se produce colocando la sangre en el tubo por encima de la capa de gel y sometiendo el tubo a una fuerza centrífuga especificada durante un tiempo determinado. Mediante lavados y centrifugaciones subsiguientes se reduce la cantidad de plaquetas. Las preparaciones de células mononucleares viables así obtenidas se pueden utilizar para PCC.

- 1) Conservar los tubos de LeucoPREP (10 mL) en posición vertical y a temperatura ambiente (18–25 °C).
- 2) Extraer la sangre por venopunción en un tubo heparinizado.
- 3) La sangre anticoagulada con heparina se debe someter a separación durante las dos horas siguientes a la obtención de la muestra.
- 4) Agregar a cada tubo de LeucoPREP de 8 a 10 mL de sangre no diluida y centrifugar durante 15 min a 400–600 g a temperatura ambiente.
- 5) Después de la centrifugación, las células mononucleares y las plaquetas formarán una capa blanca y esponjosa justo debajo de la capa de plasma. Aspirar el máximo posible de plasma, sin aspirar células. Retirar la capa de células con una pipeta de Pasteur y transferirlas a un tubo de centrifuga cónico de 10 mL con tapa.
- 6) Suspender de nuevo las células removiendo suavemente. Agregar medio F10 (10 mL), mezclar las células invirtiendo los tubos 3 o 4 veces y centrifugar durante 10 min a 100 g.
- 7) Repetir el paso 5.

B. Sistema de gradiente Ficoll-Hypaque

La solución acuosa Ficoll-Hypaque tiene una densidad de $1,077 \pm 0,001$ g/mL y contiene 5,7 g de Ficoll 400 y 9 g de amidotriozato de sodio por 100 mL.

- 1) Extraer la sangre por venopunción en un tubo heparinizado.
- 2) Diluir las muestras de sangre con un volumen igual de solución salina equilibrada.
- 3) Colocar alrededor de 5 mL de sangre diluida (gota a gota) sobre el Ficoll-Hypaque (3 mL) sin que se mezclen.
- 4) Centrifugar los tubos durante 30 min a 400 g a 8–10 °C.

- 5) Retirar los linfocitos (capa intermedia) y lavarlos tres veces (centrifugar a 100 g durante 10 min) con 5 mL de medio de cultivo F-10 más 5 % de suero de ternera fetal.

Los linfocitos aislados se pueden utilizar inmediatamente para las pruebas de PCC o se pueden congelar para utilizarlos más adelante.

III-1.2. Congelación de los linfocitos aislados

Después del segundo lavado con F-10 y centrifugación, resuspender el sedimento de células removiendo suavemente para obtener una suspensión celular 1:1 de F-10 + 40 % de suero de ternera fetal (FCS): F-10 + 40 % de FCS + 20 % de DMSO. Preparar las suspensiones celulares de modo que en cada ampolla (1,5 mL) haya alrededor de 8×10^6 de linfocitos aislados. Para congelar, el mejor método es utilizar un aparato que pueda reducir la temperatura progresivamente. Por último, conservar las ampollas congeladas a -110°C o en nitrógeno líquido.

III-1.3. Descongelación de los linfocitos aislados

Sacar las ampollas de linfocitos del congelador y ponerlas directamente al baño María (37°C). Cuando se hayan fundido ligeramente, transferir la suspensión entera a un tubo de centrifugadora (10 mL). Agregar 10 mL de RPMI frío (4°C) + 40 % de FCS a la suspensión de linfocitos, despacio, gota a gota (en alrededor de 30 min), seguidamente centrifugar durante 10 min a 100 g. Resuspender el sedimento de células en 5 mL de RPMI + 5 % de FCS. Estos linfocitos se pueden utilizar en pruebas de PCC.

III-1.4. Obtención y preparación de células mitóticas de ovario de hámster chino

Las células de ovario de hámster chino (CHO) se cultivan en frascos o botellas rotatorias (750 mL) en medio completo (F-10 + 15 % de suero de ternera recién nacida y antibióticos (penicilina 100 UI/mL y estreptomina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)). Se agrega Colcemid (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a las células, que se multiplican exponencialmente, y se recuperan las células mitóticas mediante un procedimiento estándar de desprendimiento selectivo por agitación, entre 4 y 5 horas más tarde. Las células CHO también se pueden cultivar durante más de dos ciclos celulares (~32 horas) en un medio completo enriquecido con BrdU (a concentración final de 5 μM). Las células mitóticas CHO obtenidas se teñirán de forma distintiva y aparecerán con un tono pálido en la subsiguiente tinción FPG de color. De ese modo, los linfocitos PCC se distinguirán mejor entre células CHO mitóticas.

1) Congelación de células mitóticas CHO

Las células mitóticas CHO se pueden preparar para uso inmediato en pruebas de fusión o se pueden recuperar de reservas congeladas en medio completo enriquecido con un 8 % de DMSO. Repartirlas en pequeñas fracciones ($2,5 \times 10^6$ /ampolla de 1,5 mL) y conservarlas a -110°C .

2) Descongelación de las células mitóticas CHO

Sacar las células mitóticas CHO del congelador y colocarlas en un baño María a 37°C , y transferir seguidamente la suspensión a un tubo de centrifuga agregando 10 mL de medio. Centrifugar durante 10 min a 100 g. Desechar el sobrenadante, agregar medio (5 mL) y mantenerlas en hielo hasta que se utilicen.

III-1.5. Preparación de la solución de macrogol (PEG)

Poner 400 mg de PEG (M.W. 1450, Sigma, 40 % m/v) en un tubo de centrifuga pequeño (10 mL) y de fondo redondo y agregar 600 μL de solución salina equilibrada de Hank (HBSS) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) o medio F-10, y poner los tubos al baño María a 37°C durante 15 min. Otra opción es fundir primero el PEG en un horno y mezclarlo luego con HBSS o PBS o medio F-10.

III-1.6. Fusión celular

- 1) Lavar los linfocitos interfásicos y las células mitóticas CHO, una vez y por separado, con HBSS o F-10 (5 mL). Centrifugar durante 5 min a 100 g y desechar el sobrenadante. En un tubo de cultivo de fondo redondo mezclar las células interfásicas con las células mitóticas (5:1) en 10 mL de medio F-10 y centrifugar durante 5 min a 100 g (a velocidades superiores el sedimento de células se puede compactar demasiado).
- 2) Decantar el sobrenadante y mantener el tubo invertido. Secar las gotas de medio restantes colocando los tubos boca abajo en una gradilla o sobre papel absorbente.
- 3) Si en el tubo se forman burbujas de aire sobre el sedimento de células, hay que eliminarlas con una pipeta de Pasteur.
- 4) Con una micropipeta (200 μ L), tomar 0,15 mL de PEG y colocarlos directamente en el sedimento de células; colocar el tubo en una gradilla durante 1,5 min. Agitar muy suavemente, solo tres veces (a intervalos de 30 s). Llegados ahí, el sedimento de células se debe haber desprendido del fondo del tubo, formando grumos en la solución de PEG.
- 5) Agregar 1,5–2 mL de F-10 o PBS muy lentamente durante 3 min (0,5 mL por min). Mezclar la suspensión celular volteando suavemente el tubo.
- 6) Centrifugar el tubo durante 5 min a 100 g.
- 7) Decantar completamente el sobrenadante y agregar 0,5 mL de medio de cultivo (F-10 más un 15 % de suero de ternera fetal). Por último, agregar 50 μ L de Colcemid (concentración final 1 μ g/mL), volteando suavemente el tubo para que se formen pequeños grumos. Incubar el tubo de ensayo a 37 °C durante 1 hora. En ese momento se habrán completado la fusión celular y la inducción de la PCC.

III-1.7. Protocolo de fijación

- 1) Agregar a cada tubo 7–8 mL de solución hipotónica (KCl, 5,6 g/L) precalentada e incubar durante 10 min a 37 °C.
- 2) Centrifugar el tubo durante 5 min a 100 g.
- 3) Desechar el sobrenadante hasta 0,5 mL por encima del sedimento de células. Las células se fijan en 5 mL de metanol: ácido acético (3:1).
- 4) Centrifugar el tubo durante 5 min a 100 g.
- 5) Repetir otras dos veces los pasos 3 y 4.
- 6) Después de la última centrifugación, desechar el sobrenadante y dejar alrededor de 0,3 mL de solución fijadora sobre el sedimento de células. Seguidamente, desagregar suavemente el sedimento y añadir alrededor de 0,5–1 mL de fijador volteando suavemente el tubo.

III-1.8. Obtención de la preparación

Con una pipeta de Pasteur, colocar gotas de las células en portaobjetos limpios. Al observar la formación de anillos de Newton, iluminar cuidadosamente con una lámpara de infrarrojos.

III-1.9. Protocolos de tinción

Si las células mitóticas CHO no están premarcadas con BrdU, las preparaciones se pueden teñir con una solución acuosa de Giemsa al 3 % (R66 mejorado de Gurr) durante 5 min.

Cuando las células mitóticas CHO están premarcadas con BrdU, las preparaciones se pueden teñir con la técnica de FPG (sección 9.3). Por último, aclarar las preparaciones con agua destilada, dejarlas secar y montarlas colocando un cubreobjetos de 24 x 60 mm. Sin embargo, téngase presente la reserva expuesta en la sección 11.2.1.6 de que a menudo este no es el método de tinción preferente y que basta con una tinción Giemsa simple.

Para bandeos C de los PCC (para el análisis de dicéntricos), las preparaciones recién obtenidas se tratarán con HCl 1N durante 5 min, lavándose seguidamente en HCl 0,2N durante 5 min. A continuación, los portaobjetos se secan con papel absorbente y se tratan con una solución (5 %) de Ba(OH)₂ (5 %) durante 3 min a temperatura ambiente. Se lavan las preparaciones en HCl 0,2N durante 5 min y se incuban en SSC 2 x a 60 °C durante 30 min. Lavar con tampón de Gurr (pH = 6,8) y teñir con Giemsa al 6 % durante 30 min. Por último, aclarar las preparaciones con agua del grifo, dejarlas secar y montarlas colocando un cubreobjetos. Adviértase que el procedimiento es ligeramente distinto del descrito en la sección 9.3.3, aunque los dos funcionan.

Para detectar traslocaciones se pueden utilizar sondas específicas de cromosomas enteros con una sonda pancetromérica siguiendo el mismo protocolo que para las metafases (véanse el anexo II y la figura 37). Luego se pueden detectar simultáneamente los dicéntricos y las traslocaciones.

III-2. PCC POR INDUCCIÓN QUÍMICA

III-2.1. Utilizando linfocitos aislados

- 1) Colocar 3 mL de sangre entera heparinizada en un tubo de LeukoPREP o Ficol-Hypaque.
- 2) Centrifugar a 700 g durante 15 min a temperatura ambiente.
- 3) Transferir los linfocitos aislados a un tubo de ensayo de 15 mL que contenga 5 ml de medio enriquecido con un 20 % de suero de ternera fetal para lavado.
- 4) Centrifugar a 200–400 g durante 10 min a 4 °C.
- 5) Suspender de nuevo los linfocitos en 6 mL de medio de cultivo enriquecido con un 20 % de suero de ternera fetal y PHA.
- 6) Incubar a 37 °C durante 47 horas (un paso opcional es agregar Colcemid, 40 ng/mL, a las 24 horas de tiempo de cultivo).
- 7) Agregar al cultivo caliculina A a la concentración final de 50 nM e incubar a 37 °C durante 1 hora.
- 8) Preparar una solución hipotónica caliente (37 °C) de KCl 0,075M.
- 9) Centrifugar las células a 200–400g durante 5–10 min y retirar el sobrenadante.
- 10) Agregar 2 mL de KCl 0,075M al sedimento de células e incubar a 37 °C durante 20 min.
- 11) Agregar 30 µL de metanol/ácido acético (3:1) y voltear el tubo.
- 12) Centrifugar a 200–400 g durante 5-10 min a temperatura ambiente.
- 13) Agregar 1,8 mL de metanol: ácido acético después de retirar el sobrenadante y transferir a un tubo de 2 mL.
- 14) Conservar el tubo a -20 °C hasta preparar los portaobjetos.

III-2.2. Utilizando sangre entera heparinizada

- 1) Colocar 0,75 mL de sangre entera heparinizada en un tubo de ensayo de 15 mL.
- 2) Agregar medio de cultivo enriquecido con un 20 % de suero de ternera fetal y PHA hasta obtener un volumen total de 10 mL.
- 3) Incubar a 37 °C durante 47 horas (un paso opcional es agregar Colcemid, 40 ng/mL, a las 24 horas de tiempo de cultivo).

- 4) Agregar al cultivo caliculina A a la concentración final de 30 nM e incubar a 37 °C durante 1 hora.
- 5) Centrifugar a 200–400 g durante 5-10 min a temperatura ambiente.
- 6) Agregar 5 mL de KCl 0,075M después de retirar el sobrenadante, e incubar a 37 °C durante 25 min.
- 7) Agregar 30 µL de metanol: ácido acético y voltear el tubo.
- 8) Centrifugar a 200–400 g durante 5-10 min a temperatura ambiente.
- 9) Agregar 2 mL de metanol: ácido acético 3:1.
- 10) Repetir los pasos 8 y 9 hasta que el sedimento esté transparente y sea incoloro.
- 11) Transferir la suspensión de células a un tubo de 2 mL.
- 12) Conservar el tubo a -20 °C hasta preparar los portaobjetos.

Anexo IV

PRUEBA DE MICRONÚCLEOS CON BLOQUEO DE LA CITOCINESIS

Se presenta a continuación un protocolo estándar simple que da buen resultado. Existen otros métodos, con pasos más procedimentales y que utilizan cultivos de linfocitos aislados [1], pero a efectos de la dosimetría biológica sistemática bastan los cultivos de sangre entera.

IV-1. PROTOCOLO ESTÁNDAR PARA LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS CON BLOQUEO DE LA CITOCINESIS

- 1) La muestra de sangre se extrae con un anticoagulante de heparina de litio.
- 2) Por regla general se agregan 0,5 mL de sangre entera a 4,5 mL de medio de cultivo (RPMI-1640) enriquecido con 10 a 15 % de suero de ternera fetal termoinactivado, L-glutamina y antibióticos. Se agregan al cultivo 100 μ L de fitohemaglutinina (por ejemplo, PHA-M, Sigma, 25 mg/25 mL H₂O), obteniéndose una concentración final de 20 μ g/mL.
- 3) Se cultiva la sangre en frascos de cultivo tisular a 37 °C, 5 % CO₂ en atmósfera humidificada.
- 4) A las 24 horas de la estimulación con PHA se agregan al cultivo 20 μ L de citocalasina B (Cyt-B), obteniéndose una concentración final de 6 μ g/mL. Se trata de la concentración óptima para acumular células BN en cultivos de sangre entera. Dado que la Cyt-B se disuelve mal en una solución acuosa, hay que preparar una solución madre de Cyt-B en dimetil sulfóxido (5 mg Cyt-B en 3,3 mL de DMSO), separarla en fracciones y conservarla a -20 °C hasta su uso.
- 5) El cultivo llega a término a las 68–72 horas después de la estimulación con PHA. El momento de la cosecha elegido debe maximizar el número de células BN obtenidas, reduciendo al mínimo el de células mononucleadas o multinucleadas.
- 6) Se centrifugan suavemente las células a 180 g durante 10 min y se elimina el medio de cultivo sobrenadante.
- 7) Se someten las células a tratamiento hipotónico con 7 mL de KCl 0,075M frío (4 °C) para lisar los hematíes y se centrifuga inmediatamente a 180 g durante 10 min.
- 8) Se elimina el sobrenadante, que se sustituye por 5 mL de fijador recién preparado con metanol: ácido acético (10:1) diluido 1:1 con solución de Ringer (4,5 g NaCl, 0,21g KCl, 0,12 g CaCl₂ en 500 mL H₂O). Hay que agregar el fijador agitando las células para impedir que se formen grumos. Seguidamente, se centrifugan las células de nuevo a 180 g durante 10 min.
- 9) Las células se lavan dos o tres veces con fijador recién preparado a base de metanol: ácido acético (10:1), esta vez sin solución de Ringer, renovando el fijador cada vez, hasta que la suspensión de células está clara.
- 10) Seguidamente, se retira el sobrenadante hasta 1 cm o menos por encima del sedimento de células (en función del tamaño del sedimento), se resuspenden las células delicadamente, y se vierte la suspensión gota a gota sobre portaobjetos limpios, que se dejan secar al aire.
- 11) Para análisis al microscopio óptico, las células se pueden teñir en Giemsa al 2–6 % (por ejemplo, solución de Giemsa de azur-eosina-azul de metileno, de Merck) en tampón HEPES (0,03M ; pH 6,5) durante 10–20 min a oscuras, seguido de un rápido aclarado en agua destilada y secado al aire. O bien, para microscopia de fluorescencia, las células se pueden teñir con naranja de acridina (10 μ g/mL en solución salina tamponada con fosfato a pH 6,9) durante 2–3 segundos.

IV-2. PROTOCOLO DE TINCIÓN DE CENTRÓMEROS DE MICRONÚCLEOS

Para analizar los centrómeros de los MN se puede utilizar una sonda pancentromérica FISH comercial. La sonda pancentromérica también se puede preparar por amplificación de la PCR (cebador directo: 5'-GAA GCT TAA CTC ACA GAG TTG AA-3' cebador inverso: 5'-GCT GCA GAT CAC AAA GAA GTT TC-3') [2].

A continuación figura el protocolo de hibridación *in situ* para la sonda comercial:

- 1) Se obtienen las preparaciones según el protocolo estándar de CBMN presentado más arriba (hasta el paso 10).
- 2) Deshidratar las células pasando las preparaciones por una serie de etanol de 70–90–100 %, 2 min en cada paso, y secar al aire.
- 3) Desnaturalizar las preparaciones:
 - i) desnaturalizar la cromatina sobre el portaobjetos en formamida 70 % en SSC 2 x durante 2 min a 70 °C;
 - ii) sumergir las preparaciones en etanol 70 % enfriado en hielo y deshidratar a través de una serie de etanol de 70–90–100 %, 5 min e cada paso, sin dejar de agitar.
- 4) Desnaturalizar la sonda inmediatamente antes de utilizarla:
 - i) calentar la sonda a 37 °C durante 5 min;
 - ii) desnaturalizar la sonda a 85 °C durante 10 min (10 µL/sonda);
 - iii) mezclar bien y centrifugar rápidamente;
 - iv) enfriar inmediatamente con hielo y conservar a oscuras.
- 5) Hibridación:
 - i) aplicar 10 µL de la sonda a la preparación, tapar con un cubreobjetos y sellar con adhesivo;
 - ii) hibridar durante una noche entera a 37 °C a oscuras en un dispositivo de humidificación.
- 6) Lavado posterior a la hibridación:
 - i) retirar el adhesivo, sumergir brevemente las preparaciones en formamida al 50 % y retirar el cubreobjetos;
 - ii) lavar los portaobjetos en SSC 2x durante 5 min a 37 °C;
 - iii) lavar los portaobjetos dos veces en formamida al 50 % a 37°C durante 5 min cada vez;
 - iv) lavar los portaobjetos en SSC 2x durante 5 min a 37 °C;
 - v) lavar en solución de lavado Tween (0,05 % en SSC 2x) durante 5 min a 37 °C;
 - vi) verter una gota de DAPI/producto de montaje antidesleído en un cubreobjetos y colocarlo sobre la preparación.
- 7) Las preparaciones se pueden conservar a temperatura ambiente, a oscuras, o se pueden examinar inmediatamente al microscopio de fluorescencia.

IV-3 PRUEBA DE MICRONÚCLEOS Y CITOMA CON BLOQUEO DE LA CITOCINESIS EN LINFOCITOS AISLADOS (CBMN Cyt)

Se ha publicado recientemente el protocolo pormenorizado de la prueba CBMN Cyt [1]. En Fenech *et al.* [3] se puede consultar una colección completa de fotografías de los diversos tipos de células examinados en la prueba CBMN Cyt.

IV-4 CÁLCULO DEL ERROR DEL ÍNDICE DE DIVISIÓN NUCLEAR PARA LA PRUEBA CBMN

La fórmula para calcular el índice de división nuclear (NDI) y la varianza del NDI (para la prueba de micronúcleos, MN) que figura en la sección 12.4.3 es la siguiente:

$$NDI = \frac{(M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4)}{N} \quad (IV-1)$$

$$\text{var}(NDI) = \sum_{i=1}^4 M_i^2 \text{var}(M_i) + 2 \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 M_i M_j \text{cov}(M_i, M_j) \quad (IV-2)$$

En el cuadro IV-1 se presenta un ejemplo desarrollado de cálculo del NDI y la varianza.

CUADRO IV-1. DISTRIBUCIÓN DE MICRONÚCLEOS

Número de células con 1, 2, 3 o 4 micronúcleos					
N	1	2	3	4	NDI
500	169 ± 111,878	239 ± 124,758	48 ± 43,392	44 ± 40,128	1,934

En el cuadro IV-1 se presenta el número de células con 1, 2, 3 o 4 micronúcleos de un total de 500 células. El NDI se calcula según la ec. (IV-1) *supra*:

$$NDI = (169 + 2 \times 239 + 3 \times 48 + 4 \times 44) / 500 = 1,934$$

Los valores de la varianza para cada valor se calculan utilizando la ecuación binomial (ec. IV-3):

$$\text{var}(M_i) = N(M_i / N)(1 - (M_i / N)) \quad (IV-3)$$

Por consiguiente, para M_1 :

$$\text{var}(M_1) = 500 (169 / 500) (1 - (169 / 500)) = 111,878$$

NB: Téngase presente que todas las cifras que se dan aquí se han calculado con Microsoft Excel, siendo los valores correctos hasta un gran número de decimales. Sin embargo, para simplificar, los valores presentados en el texto se han redondeado al tercer decimal, de modo que si se utilizan esos valores con una calculadora no se obtendrán exactamente los mismos resultados.

Para calcular la $\text{var}(NDI)$, primero hay que obtener la suma del cuadrado de cada valor de M_i multiplicada por su varianza:

$$\sum_{i=1}^4 M_i^2 \text{var}(M_i) \quad IV-4$$

Sin embargo, dado que la covarianza solo se puede calcular correctamente a partir del número total de células con $M = 1$ a 4 , en la ecuación hay que sustituir M por los siguientes valores de M' :

CUADRO IV-2. VALORES CALCULADOS DE M_i^{\wedge} Y $VAR(M_i^{\wedge})$

N	Valores de M_i^{\wedge} para la ec. (IV-2)			
	1	2	3	4
967	169 ± 139,464	478 ± 241,719	144 ± 122,556	176 ± 143,967

Los valores de M se han recalculado de modo que $M_1^{\wedge} = 1 \times 169$; $M_2^{\wedge} = 2 \times 239$; $M_3^{\wedge} = 3 \times 48$ y $M_4^{\wedge} = 4 \times 44$. El valor de n es la suma de esos componentes, que se calcula del modo siguiente:

$$n = (169 + 2 \times 239 + 3 \times 48 + 4 \times 44) = 967$$

Los valores de la varianza se recalculan según la ec. (IV-3), pero utilizando los nuevos valores de M_i^{\wedge} y n, por ejemplo:

$$var(M_2^{\wedge}) = 967 \times (478 / 967) \times (1 - (478 / 500)) = 241,719$$

Los valores de M_i y $var(M_i)$ del cuadro IV-2 se pueden utilizar entonces para calcular la primera parte de la $var(NDI)$, según la ec. (IV-4):

$$\begin{aligned} & \sum_{i=1}^4 M_i^{\wedge 2} var(M_i^{\wedge}) \\ &= M_1^{\wedge 2} \times var(M_1) + M_2^{\wedge 2} \times var(M_2) + M_3^{\wedge 2} \times var(M_3) + M_4^{\wedge 2} \times var(M_4) \\ &= (169^2 \times 139,464) + (478^2 \times 241,719) + (144^2 \times 122,556) + (176^2 \times 143,967) \\ &= 66\,212\,947,630 \end{aligned}$$

Seguidamente, según la ec. (IV-1), hay que obtener la covarianza de cada conjunto de datos, que se puede calcular según la fórmula:

$$cov(M_i^{\wedge}, M_j^{\wedge}) = -np_i p_j \quad (IV-5)$$

En esta ecuación, p_i y p_j son la probabilidad de observar las distintas cantidades de micronúcleos en las células binucleadas, con lo que para M_1 a M_4 , las probabilidades se calculan del modo siguiente:

$$\begin{aligned} p_1 &= 169 / 967 = 0,175 \\ p_2 &= (2 \times 239) / 967 = 0,494 \\ p_3 &= (3 \times 48) / 967 = 0,149 \\ p_4 &= (4 \times 44) / 967 = 0,182 \end{aligned}$$

Por lo tanto, la covarianza de M_1^{\wedge} y M_2^{\wedge} se calcula según la ec. (IV-5):

$$cov(M_1^{\wedge}, M_2^{\wedge}) = -967 \times 0,175 \times 0,494 = -83,539$$

Los valores de la covarianza se calculan entonces de modo similar para cada conjunto de M_i^{\wedge} , M_j^{\wedge} :

$$\begin{aligned} cov(M_1^{\wedge}, M_3^{\wedge}) &= -967 \times 0,175 \times 0,149 = -25,166 \\ cov(M_1^{\wedge}, M_4^{\wedge}) &= -967 \times 0,175 \times 0,182 = -30,759 \\ cov(M_2^{\wedge}, M_3^{\wedge}) &= -967 \times 0,494 \times 0,149 = -71,181 \\ cov(M_2^{\wedge}, M_4^{\wedge}) &= -967 \times 0,494 \times 0,182 = -86,999 \\ cov(M_3^{\wedge}, M_4^{\wedge}) &= -967 \times 0,149 \times 0,182 = -26,209 \end{aligned}$$

Hay que calcular entonces los distintos componentes de la segunda parte de la ec. (IV-2). Por ejemplo, para $i = 1$ y $j = 2$:

$$M_1^{\wedge} M_2^{\wedge} cov(M_1^{\wedge}, M_2^{\wedge}) = 169 \times 478 \times (-83,539) = -6748429,704$$

De modo similar, para poder realizar las sumas de $i = 1$ a 4 y $j = i+1$ a 4:

$$\begin{aligned} M_1^{\wedge} M_3^{\wedge} cov(M_1^{\wedge}, M_3^{\wedge}) &= 169 \times 144 \times (-25,166) = -612\,451,806 \\ M_1^{\wedge} M_4^{\wedge} cov(M_1^{\wedge}, M_4^{\wedge}) &= 169 \times 176 \times (-30,759) = -914\,897,142 \\ M_2^{\wedge} M_3^{\wedge} cov(M_2^{\wedge}, M_3^{\wedge}) &= 478 \times 144 \times (-71,181) = -4\,899\,528,670 \end{aligned}$$

$$M_2 \backslash M_4 \text{ cov}(M_2 \backslash, M_4 \backslash) = 478 \times 176 \times (-86,999) = -7\,319\,049,001$$

$$M_3 \backslash M_4 \text{ cov}(M_3 \backslash, M_4 \backslash) = 144 \times 176 \times (-26,209) = -664\,238,196$$

Una vez calculados todos los componentes, se pueden sumar según la segunda parte de la ec. (IV-2), obteniéndose un total de -21 158 594,519. Según la ec. (IV-2), la varianza del NDI es, por consiguiente:

$$\text{var}(\text{NDI}) = 66\,212\,947,630 + 2 \times (-21\,158\,594,519) = 23\,895\,758,592$$

Para transformar el resultado en un valor normalizado de error estándar, con el fin de presentarlo con el valor del NDI, se utiliza la ecuación siguiente:

$$SE(\text{NDI}) = \frac{\sqrt{\text{var}(\text{NDI})}}{n} \bigg/ \sqrt{n} = \frac{\sqrt{\text{var}(\text{NDI})}}{n^{3/2}} \quad (\text{IV-6})$$

Utilizando los valores calculados antes, se obtiene un valor del error estándar de:

$$SE(\text{NDI}) = (23\,895\,758,592)^{(1/2)} / 967^{(3/2)} = 0,163$$

Por consiguiente, el valor del NDI calculado con los datos del cuadro IV-1 es de $1,934 \pm 0,163$.

Anexo V

CRITERIOS PARA DETERMINAR EL ÍNDICE MITÓTICO

El procedimiento para determinar el índice mitótico para la prueba de dicéntricos es el siguiente:

- Excluir los núcleos de las células polimorfonucleares, las células no estimuladas (núcleos pequeños), muertas o moribundas y los micronúcleos.
- Contar el número de núcleos de las células mitóticas y las células estimuladas (blastocitos con núcleos grandes) y utilizar la ec. (V-1) para calcular el índice mitótico de las células estimuladas.

Dada la variedad de tamaños de los núcleos de las células estimuladas, hay que establecer un límite arbitrario que separe los núcleos pequeños estimulados de los núcleos no estimulados. En las “extensiones metafásicas” se incluyen las profases y las anafases.

$$\text{Índice mitótico} = \frac{(\# \text{metafases}) \times 100}{\# \text{metafases} + \text{blastos}} \quad (\text{V-1})$$

En la figura V-1, el índice mitótico sería $(3/(3+12)) \times 100 = 20\%$, aunque por regla general en el análisis completo del índice mitótico se cuentan 500 células.

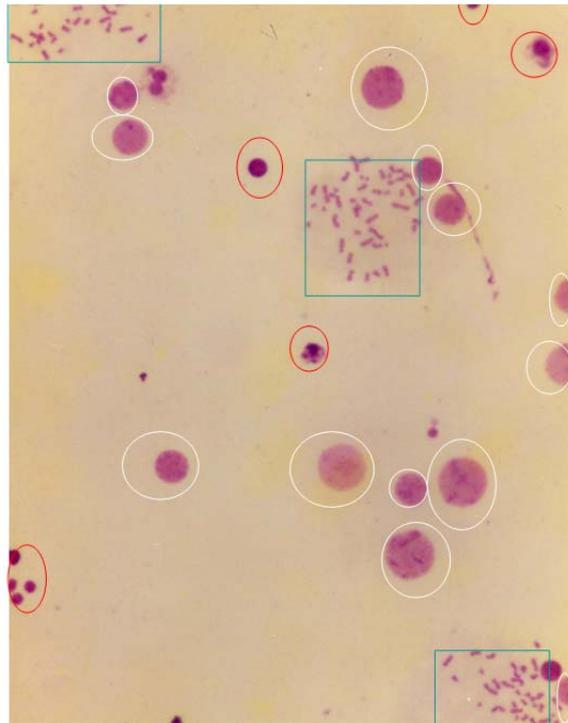


Fig. V-1. Imagen a poco aumento de una preparación típica de cultivo de linfocitos. Los círculos blancos señalan núcleos que se contabilizan como blastos, los círculos rojos, núcleos que no se cuentan, los rectángulos, extensiones metafásicas.

Anexo VI

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En secciones precedentes, en particular en las secciones 8 y 9, se han dado ejemplos de cálculos mediante procedimientos estadísticos aplicados el análisis y la interpretación de datos de biodosimetría citogenética. Existe una gran variedad de libros de texto sobre estadística, algunos de ellos orientados específicamente a las aplicaciones biológicas y biomédicas. Por consiguiente, en la presente publicación no se abarcan los procedimientos estadísticos de forma muy pormenorizada. No obstante, en este anexo se ofrece una breve introducción a las pruebas y distribuciones estadísticas utilizadas más a menudo en el campo de la biodosimetría citogenética. En la parte 3 de este anexo figura una rutina informática para el ajuste de la curva de dosis-respuesta.

VI-1. MÉTODOS ESTADÍSTICOS BÁSICOS DE USO EN CITOGÉNÉTICA

VI-1.1. Error estándar y desviación estándar

La desviación estándar (SD) de un conjunto de datos es simplemente una medida del promedio de la dispersión (distancia) de las cifras respecto de su valor promedio. Da una indicación de lo dispersos que están los valores en el conjunto de datos.

El error estándar de la media (EEM) es una medida de la probable desviación de la media de la muestra respecto de la media verdadera de la población. Equivale a la desviación estándar estimada del error del método. El EEM cuantifica la exactitud con que se conoce la verdadera media de la población. El EEM disminuye a medida que aumenta el tamaño de la muestra, porque es mucho más probable que la media de una muestra grande esté más cerca de la verdadera media de la población que la media de una muestra pequeña.

VI-1.2. valores de p

El valor de p representa la probabilidad de obtener un resultado que sea por lo menos tan extremo como un punto de datos dado, en el supuesto de que el punto de datos es resultado solo del azar. Por ejemplo, dada la hipótesis nula de que dos medias poblacionales son idénticas, un valor de p de 0,03 representaría una probabilidad del 3 % de observar una diferencia tan grande como la diferencia medida si la hipótesis nula fuera verdadera. El muestreo aleatorio de poblaciones idénticas daría una diferencia menor que la medida en el 97 % de los experimentos, y mayor que la medida en el 3 % de los experimentos.

En las pruebas estadísticas, si $p >$ el nivel de significación (a menudo 0,05), los datos no se apartan significativamente del modelo previsto y, por lo tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula. Importa señalar que, en la situación precedente, la afirmación de que se tiene una seguridad del 95 % de que el valor verdadero desconocido del parámetro está contenido en el intervalo definido por los límites de confianza significa en realidad que el intervalo se ha definido utilizando un procedimiento que logra dar los resultados correctos en un 95 % de los casos.

En el caso de comparaciones múltiples, el valor de p se debe modificar del modo siguiente: Para un número N de hipótesis nulas independientes, la probabilidad de obtener por azar uno o más valores de p inferiores al umbral, $t = 0,05$, es de $100(1,00 - 0,95^N)$. El umbral necesario para asegurarse de que el riesgo general de rechazar incorrectamente una hipótesis nula verdadera es $\leq 0,05$ es de $1,00 - 0,95^{(1/N)}$.

VI-1.3. Prueba de la ji al cuadrado

La prueba de la ji al cuadrado (la desviación residual, o suma residual de los cuadrados de las desviaciones (χ^2 de Pearson)) se utiliza para evaluar estadísticamente las diferencias significativas entre proporciones de resultados que siguen una distribución normal. El valor de p para χ^2 (con el número de grados de libertad asociado) da la probabilidad de que las diferencias entre los resultados se deban al azar. Es usual fijar el nivel de significación en

el 95 %, lo que significa que para un conjunto de datos que sigue una distribución normal, cabría prever ese grado de variación únicamente un 5 % de las veces.

En la prueba de la ji al cuadrado aplicada a la homogeneidad se compara un cierto número de mediciones, para comprobar la hipótesis nula de que las frecuencias relativas de los sucesos observados siguen la distribución de la ji al cuadrado. En citogenética, la prueba de la ji al cuadrado aplicada a la homogeneidad se utiliza para comprobar las diferencias entre un cierto número de conjuntos de datos, por ejemplo, la cantidad de dicéntricos observados en las células examinadas, con el fin de determinar el número de poblaciones distintas que contiene el conjunto de datos.

En general, el estadístico ji solo es fiable para muestras de tamaño superior a ~ 5 . Para tamaños de muestras inferiores se puede aplicar la corrección de Yates con el fin de reducir el error introducido al aproximar los datos a la distribución de la ji al cuadrado. En efecto, la corrección reduce el estadístico de la ji al cuadrado y, de ese modo, aumenta el valor de p asociado. No obstante, dado que la aplicabilidad de la corrección es variable y el factor de corrección puede ser demasiado grande, es aconsejable aplicarla con prudencia.

En el caso especial de comparación de dos muestras, se prevé que los datos seguirán una distribución binomial. En este caso, χ^2 se calcula utilizando la aproximación normal a la distribución binomial, que es la prueba de la ji al cuadrado con un grado de libertad. La versión binomial de la prueba de la ji al cuadrado se puede utilizar para comparar un conjunto único de recuentos observados y recuentos previstos, por ejemplo, la cantidad de dicéntricos de una muestra de sangre de control, no expuesta, con la cantidad de una muestra expuesta.

VI-1.4. Prueba de la t

La prueba de la t es una prueba de hipótesis estadística en la cual la hipótesis nula es verdadera si el estadístico de prueba, t, sigue una distribución t. La prueba es válida para muestras pequeñas, en las que no se puede especificar que la población siga una distribución normal porque la desviación estándar de la población es incierta. En la prueba de la t se tiene en cuenta el efecto del azar, para lo cual se incorpora información acerca del número de muestras. En citogenética, la prueba de la t se suele utilizar para determinar si la diferencia entre dos recuentos de Poisson es significativa, comparándose las medias con el fin de determinar si los dos conjuntos de datos proceden de la misma población. También en este caso, el valor de p se utiliza para determinar si las diferencias entre las muestras son significativas, y el nivel de significación suele establecerse en el 95 %, o 0,05.

Existe un cierto número de formas distintas de la prueba de la t, que tienen validez en situaciones distintas. La prueba de la t para datos emparejados se utiliza con muestras que tienen dependencia directa. Un ejemplo de ello serían las cantidades de dicéntricos recontadas por dos operarios distintos en un mismo conjunto de preparaciones. En la prueba de la t para datos emparejados, las dos muestras, en este caso las células examinadas, tienen que tener siempre el mismo tamaño. Por el contrario, la prueba de la t para datos independientes se aplicaría, por ejemplo, a la cantidad de dicéntricos recontados por dos operarios distintos en dos conjuntos distintos de preparaciones. En este caso, las muestras pueden tener tamaños iguales o distintos. Las pruebas de la t pueden ser unilaterales o bilaterales. Las pruebas unilaterales se utilizan para determinar si una muestra es significativamente mayor que otra. Las pruebas bilaterales se utilizan para determinar si las diferencias entre los conjuntos de datos son significativas en alguna de las direcciones, es decir, si la muestra 1 es mayor o menor que la muestra 2.

VI-1.5. Prueba de la F

La distribución F es una distribución de probabilidad continua que equivale a la razón de dos distribuciones de ji al cuadrado. Por lo tanto, la prueba de la F, basada en esta distribución, se puede utilizar para comparar datos y determinar si proceden de la misma distribución. La

prueba de la F, o prueba de la z, se puede utilizar para verificar la significación de los coeficientes obtenidos en el ajuste de la curva por máxima verosimilitud. Cuando hay pruebas de falta de ajuste (por ejemplo, a partir de la prueba de la χ^2), hay que utilizar la prueba de la F para determinar la significación de los coeficientes. A diferencia de la prueba de la t, que se utiliza para comparar medias, en la prueba de la F se comparan las varianzas de los conjuntos de datos. El uso más común de la prueba de la F es el análisis de la varianza.

VI-1.6. Análisis de la varianza (ANOVA)

Por análisis de la varianza se entienden una serie de métodos utilizados para verificar la igualdad de las medias. En el método ANOVA se utiliza la distribución F para verificar las diferencias entre tres o más grupos independientes, que siguen una distribución normal, con homogeneidad de la varianza, o entre una serie de mediciones repetidas. En el ANOVA se evalúa la importancia de uno o más factores comparando las medias de la variable de respuesta en los diferentes niveles de los factores.

El valor de p para cada factor describe la probabilidad de que una alta varianza entre los grupos, comparada con la variación dentro de los grupos, se deba al azar. El valor de p se puede imaginar como la probabilidad de que un muestreo aleatorio dé lugar a unas medias que estén tan alejadas (o más) que las observadas en el experimento.

En citogenética, el método ANOVA se puede utilizar en cualquier circunstancia en que se precise comparar tres o más grupos, o dos o más factores. Puede tratarse, por ejemplo, de la verificación de los efectos combinados del nivel de la dosis de radiación y del fraccionamiento de la dosis, o de la exposición a la radiación y a productos químicos. Existe un gran número de formas diferentes de la prueba, pero la mayoría de los paquetes comerciales de tratamiento de datos tienen capacidad para aplicar modalidades del ANOVA, y en los textos sobre estadística se puede consultar información complementaria.

Aunque en principio el ANOVA es un método de análisis paramétrico, que por regla general solo se puede aplicar a datos con distribución normal, el tipo de datos que más a menudo se manejan en citogenética (es decir, datos que siguen una distribución de Poisson), se aproximan lo suficiente a una distribución normal para que se pueda aplicar el ANOVA. En caso contrario, se dispone de un gran número de análisis no paramétricos, como se expone a continuación.

VI-1.7. Pruebas no paramétricas

Cuando no se satisface la condición de normalidad, se pueden aplicar pruebas no paramétricas. La prueba de Wilcoxon es una prueba no paramétrica análoga a la de la t para datos emparejados. Se puede utilizar para comparar uno o dos conjuntos de datos. Se trata de una prueba del orden con signo, y por lo tanto requiere que los datos se midan cada cierto intervalo. El estadístico de la prueba verifica la igualdad de las medianas de la población. Para muestras independientes se puede utilizar la prueba de Mann Whitney. Se trata de la versión no paramétrica de la de la t, que se puede utilizar para verificar si dos conjuntos de datos no emparejados proceden de la misma distribución. En la comparación de múltiples conjuntos de datos, la prueba de Kruskal Wallis es una extensión de la prueba de Mann Whitney, que es análoga al método ANOVA.

VI-2. DISTRIBUCIONES ESTADÍSTICAS

Para modelizar la probabilidad de que un suceso tenga lugar se pueden utilizar varias formas y clases de distribuciones. Para que el análisis de los datos sea exacto importa mucho el tipo de distribución que se elija, habiéndose propuesto y aplicado varios modelos para la evaluación de los datos citogenéticos. Se examinan a continuación una selección de los modelos más comúnmente utilizados y su aplicabilidad a la citogenética de las radiaciones.

VI-2.1. Distribución de Poisson

La distribución de Poisson es una distribución de probabilidad discreta que expresa la probabilidad de que se produzcan sucesos aleatorios infrecuentes. La distribución de Poisson es con diferencia el tipo de distribución más conocido y utilizado para el análisis de datos en citogenética. Los datos de aberraciones cromosómicas suelen ser muy escasos, y Edwards *et al.* mostraron que es mucho más realista suponer que las aberraciones cromosómicas siguen una distribución de Poisson antes que una distribución normal [4]. Merkle demostró que las pruebas de la bondad del ajuste basadas en Poisson, incluidas la de χ^2 , la de la varianza y la de la u que se examinan en la presente publicación, se podían aplicar a los datos citogenéticos, en particular en el caso de las muestras de gran tamaño [5]. Se ha demostrado que, para el ajuste de la curva, el análisis de regresión se puede aplicar a los datos de tipo Poisson. Los formas resultantes del ajuste por máxima verosimilitud [6] y/o mínimos cuadrados ponderados [7] se utilizan ahora de modo casi general para obtener curvas de calibración basadas en la dosis para aberraciones cromosómicas tales como los dicéntricos y los micronúcleos.

VI-2.2. Distribución binomial

La distribución binomial es una distribución de probabilidad discreta que describe la probabilidad del número de resultados favorables de una secuencia de experimentos independientes, cada uno con dos resultados posibles. En cada caso, el resultado 1 tiene asociada una probabilidad p , y el 2 una probabilidad $1 - p$. En citogenética, un buen ejemplo de conjunto de datos que se pueden modelizar con esta distribución es el recuento de células dañadas, siendo los dos resultados “binomiales”, que la célula está dañada, o está intacta. En efecto, la distribución binomial se utiliza a menudo para calcular los errores estándar asociados con la producción de células dañadas.

VI-2.3. Modelo de Poisson mixto

Sasaki [8] ha presentado un método de análisis de los datos de aberraciones cromosómicas ideado para superar los problemas derivados de la estimación incorrecta de la dosis promedio como consecuencia de la falta de homogeneidad. La población de células comprende una mezcla de subpoblaciones, cada una de ellas expuestas a una dosis diferente, que provoca una cantidad de daño diferente. Por consiguiente, la distribución del daño cromosómico en las células se puede expresar a modo de una distribución de Poisson mixta, cuyo “despliegue” genera un perfil de la distribución de la dosis. Se ha demostrado que ese modelo proporciona un ajuste adecuado de la curva lineal cuadrática de dosis-respuesta para datos simulados y reales.

VI-2.4. Distribución binomial negativa

Igual que la distribución de Poisson, la distribución binomial negativa es una distribución de probabilidad discreta, pero tiene un parámetro adicional que se puede utilizar para representar la sobredispersión. Cuando el parámetro de sobredispersión tiende a 0, la binomial negativa tiende a Poisson [9]. Varios autores han utilizado la distribución binomial negativa en lugar de la Poisson, por ejemplo, en un estudio de 2008 de la frecuencia de traslocaciones entre los pilotos de una compañía aérea [10].

VI-2.5. Distribución de Neyman de tipo A

En 1939, Neyman introdujo esta nueva clase de distribuciones en la verificación de la diferencia entre las medias de dos muestras que tienen varianzas diferentes. Difiere así de otras pruebas estándar tales como la prueba de la z o la de la t , por ejemplo, que se basan en datos que siguen una distribución normal con desviaciones estándar conocidas y desconocidas, respectivamente, y en las cuales la varianza tiene que ser similar, cuando no idéntica. La distribución de Neyman de tipo A tiende a una distribución de Poisson generalizada a medida que aumenta el tamaño de la muestra [11]. En 2008, Morand *et al.* publicaron una nota técnica en la que se describe el programa informático NETA, que se puede utilizar para el cálculo de los

límites de confianza del 95 % de los sucesos que siguen una distribución de Neyman de tipo A [12]. Morand y sus colegas encontraron que los límites de confianza calculados mediante la distribución de Neyman eran menores que los calculados aplicando el método tradicional basado en Poisson para muestras (números de células) de pequeño tamaño [12].

VI-2.6. Otras distribuciones

La distribución beta define una familia de distribuciones de probabilidad continuas, definidas en el intervalo 0–1 por dos parámetros de forma, usualmente denominados α y β . Las distribuciones de Dirichlet son una ampliación de la distribución beta para múltiples parámetros (>2). Stiratelli *et al.* [13] compararon las distribuciones de Poisson y binomial para las lesiones cromosómicas inducidas por productos químicos con las distribuciones binomial beta, binomial negativa y binomial correlacionada. A diferencia de las distribuciones de Poisson y binomial simple, estos modelos no se basan en la independencia de la respuesta celular. Los autores constataron que todos los modelos basados en la distribución beta mostraban ajustes respecto de los modelos de Poisson y binomial (verificados con la prueba de la χ^2). El modelo beta-binomial proporcionó el mejor ajuste respecto del conjunto de datos del autor [13].

La distribución logarítmica normal fue descrita formalmente por Aitchison y Shen en 1980. La transformación logística de una distribución normal d-dimensional produce una distribución logarítmica normal en el simplex d-dimensional. Esta distribución se puede aplicar en el diagnóstico estadístico cuando la clasificación de los casos básicos plantea cierta incertidumbre, como ocurre con los datos de aberraciones cromáticas. Los autores dan ejemplos de uso, por ejemplo, en la descripción y el análisis estadístico directo de datos de composición y probabilísticos, o como sustituto de la distribución a priori conjugada de Dirichlet en el análisis de datos multinomiales y de la tabla de contingencias [14].

VI-3. RUTINA PARA EL AJUSTE DE LAS CURVAS DE DOSIS-RESPUESTA

En la sección 8.3 se han descrito programas informáticos para el ajuste de curvas. En el presente anexo se presenta un ejemplo desarrollado en el que una de las opciones informáticas, un instrumento basado en el entorno R, se aplica a los datos de ^{60}Co del cuadro 4. Mientras que los programas CABAS y Dose Estimate se pueden encontrar en forma de paquetes ya preparados, el procedimiento R necesita una rutina escrita por un matemático. La rutina necesaria ha sido ya redactada (por H. Braselmann) y se presenta aquí íntegra en el recuadro 1, dado que no se ha publicado en ningún otro lugar.

La rutina consta de cuatro partes. La primera sirve para ingresar los datos observados, es decir, las dosis, la cantidad de aberraciones, el número de células examinadas y el índice de la distribución (disp). Para ese índice hay dos opciones; se puede utilizar un valor constante para todos los puntos de dosis, o asignar un valor propio a cada dosis. En el ejemplo desarrollado se utiliza un valor constante de 1,0. La opción alternativa, que también se muestra, sería utilizar los distintos valores de σ^2/y que se muestran en el cuadro 4. (Téngase presente que en la rutina, las líneas que empiezan con el símbolo '#' son solo para información y no se ejecutan). La parte siguiente sirve para ingresar los ajustes óptimos; *i*) el coeficiente de correlación sigma, para el que se recomienda ya sea utilizar el valor 1 o bien calcular el coeficiente; *ii*) la ponderación necesaria; y *iii*) la función que se desea ajustar. Para ello, hay que ingresar 'l' para un ajuste lineal o 'lq' para un ajuste lineal cuadrático. Las dos partes restantes solo tendrían que modificarlas los desarrolladores de la rutina. Si se desean ajustar los datos a la función de dosis-respuesta lineal, los valores que se ingresarían para los datos del cuadro 4 correspondientes al ^4He se muestran a continuación del recuadro 1. A partir de ahí, la rutina es idéntica a la que figura en el recuadro 1.

Para ejecutar la rutina, hay que descargar el programa R del sitio Internet (véase la sección 8.3). En la versión en pdf de la presente publicación, copie la rutina que aparece en el recuadro 1 y péguela directamente a un procesador de textos. Sustituya los datos de entrada

del ejemplo del ^{60}Co por los suyos y elija las opciones que desee, por ejemplo, '1' o 'lq'. Cuando tenga en pantalla el programa R, pegue la rutina a partir del símbolo >.

El resultado se muestra en el recuadro 2, donde x_0 , x_1 y x_2 son, respectivamente, los coeficientes C , α y β de la ec. (2), junto con sus errores estándar. El valor de z es una prueba de la significación de cada uno de los coeficientes, con su probabilidad (Pr). Se muestran asimismo los valores de la varianza y la covarianza para cada coeficiente. Obsérvese que los valores de los coeficientes son idénticos a los que figuran en el cuadro 5 y los de la varianza/covarianza, a los mostrados en la sección 9.7.3. El programa R también da en su resultado los puntos de datos y la curva ajustada en forma de gráfico (figura VI-1).

RECUADRO 1. RUTINA DE AJUSTE DE LA CURVA APLICADA A MODO DE EJEMPLO CON LOS DATOS DE ⁶⁰CO

```

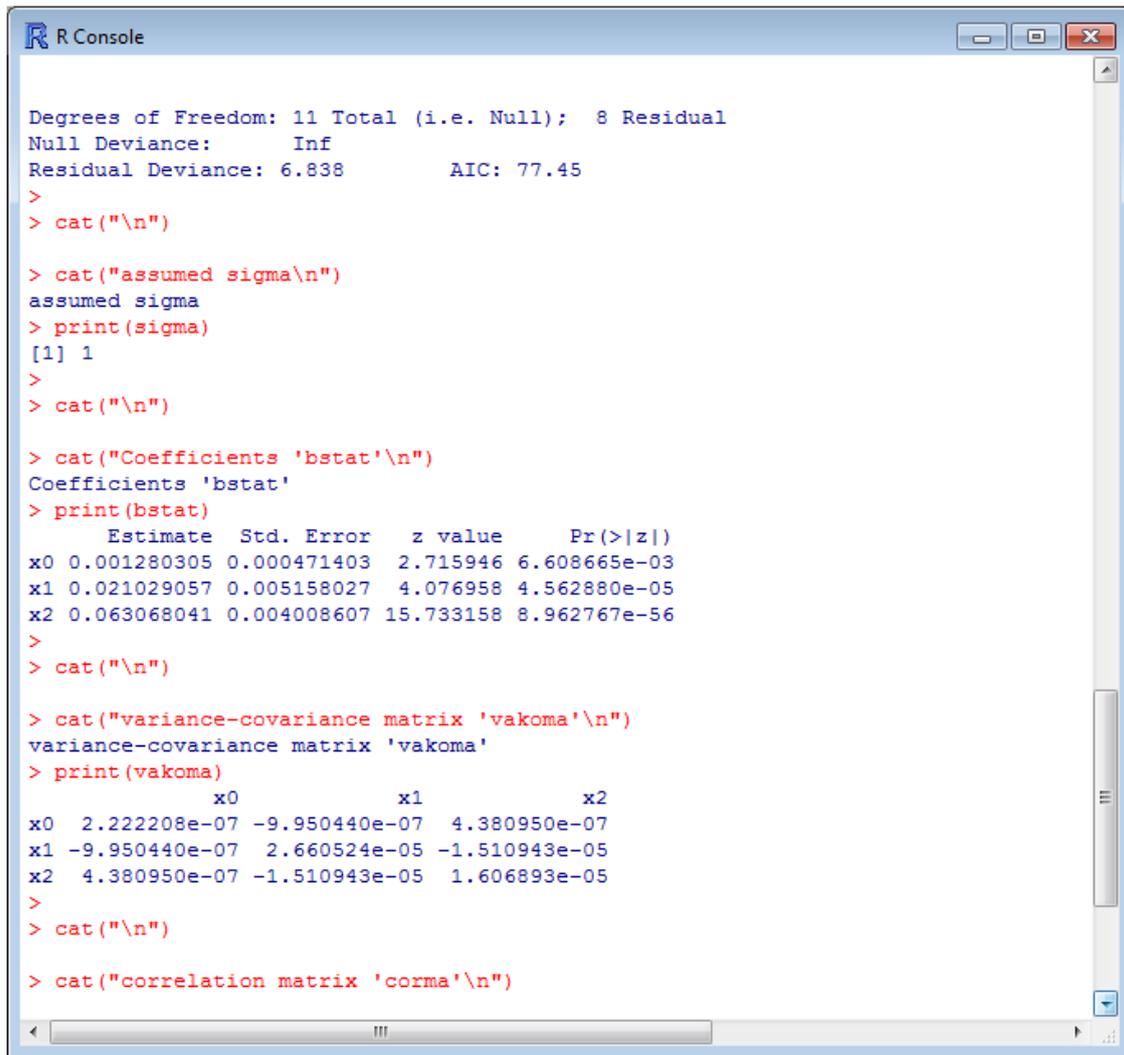
## latest changes: H. Braselmann, 2010, April 9th
##           Helmholtz Zentrum München, Department of Radiation Cytogenetics, Germany
## contact details: braselm@helmholtz-muenchen.de
## user part: data
# cobalt-60 gamma (86)
dose<-c(0,0.1,0.25,0.5,0.75,1,1.5,2,3,4,5)
ab<-c(8,14,22,55,100,109,100,103,108,103,107)
cells<-c(5000,5002,2008,2002,1832,1168,562,332,193,103,59)
disp<- 1.0
#disp<- c(1.0,1.0,1.08,0.97,1.03,1.0,1.06,1.14,0.83,0.88,1.15)
## user part: option settings
sigma<- 1 # regression sigma 1 or
#sigma<- NULL # NULL (regression sigma estimated)
wt<- 1/disp # weight setting, required!
model<- "lq"
#model<- "l"
# "l" for linear or "lq" for linear quadratic
# a background value (c) is fitted in both options
#####
## execution part: changes recommended only for developers of the script ##
#####
if (length(disp)==1) disp<- rep(disp,length(dose))
kurvendaten<-data.frame(dose,ab,cells,disp)
print(kurvdaten)
x0<-cells
x1<-cells*dose
x2<-cells*dose*dose
modelldaten<-list(x0,x1,x2,ab)
if (length(wt)==1) wt<- rep(wt,length(dose))
if (model=="lq" & sigma==1)
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1+x2,family=poisson(link = "identity"), weights=wt, data=modelldaten)
if (model=="lq" & is.null(sigma))
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1+x2,family=quasipoisson(link = "identity"), weights=wt, data=modelldaten)
if (model=="l" & sigma==1)
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1,family=poisson(link = "identity"), weights=wt, data=modelldaten)
if (model=="l" & is.null(sigma))
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1,family=quasipoisson(link = "identity"), weights=wt, data=modelldaten)
smry<-summary(result,correlation=TRUE)
#smry$coefficients
#smry$correlation
corma<-smry$correlation
bstat<-smry$coefficients
seb<-bstat[,2]
vakoma<-corma*outer(seb,seb)
vakoma<-vcov(result)
#####
## output of results ##
#####
cat("\n")
cat("Result of curve fit 'result'\n")
cat("-----\n")
print(result)
cat("\n")
cat("assumed sigma\n")
print(sigma)
cat("\n")
cat("Coefficients 'bstat'\n")
print(bstat)
cat("\n")
cat("variance-covariance matrix 'vakoma'\n")
print(vakoma)
cat("\n")
cat("correlation matrix 'corma'\n")
print(corma)
par(lwd=2)
plot(dose, ab/cells)
if (model=="lq") curve(bstat[1,1]+bstat[2,1]*x+bstat[3,1]*x*x,0,max(dose), add=TRUE)
if (model=="l") curve(bstat[1,1]+bstat[2,1]*x,0,max(dose), add=TRUE)

```

Valores de entrada para el ajuste de los datos de ^4He al modelo lineal.

```
# 20 MeV helium  $\alpha$ - particles (87)
dose<-c(0,0.051,0.104,0.511,1.01,1.536,2.05,2.526,3.029)
ab<-c(3,19,27,199,108,96,120,148,108)
cells<-c(2000,900,1029,1136,304,142,137,144,98)
disp<- 1.19
sigma<- NULL
wt<- 1/disp
model<- "l"
```

RECUADRO 2. RESULTADO DEL AJUSTE CON LOS DATOS DE ^{60}Co



```
R Console

Degrees of Freedom: 11 Total (i.e. Null);  8 Residual
Null Deviance:      Inf
Residual Deviance: 6.838      AIC: 77.45
>
> cat("\n")

> cat("assumed sigma\n")
assumed sigma
> print(sigma)
[1] 1
>
> cat("\n")

> cat("Coefficients 'bstat'\n")
Coefficients 'bstat'
> print(bstat)
      Estimate Std. Error  z value  Pr(>|z|)
x0 0.001280305 0.000471403  2.715946 6.608665e-03
x1 0.021029057 0.005158027  4.076958 4.562880e-05
x2 0.063068041 0.004008607 15.733158 8.962767e-56
>
> cat("\n")

> cat("variance-covariance matrix 'vakoma'\n")
variance-covariance matrix 'vakoma'
> print(vakoma)
           x0           x1           x2
x0 2.222208e-07 -9.950440e-07  4.380950e-07
x1 -9.950440e-07  2.660524e-05 -1.510943e-05
x2  4.380950e-07 -1.510943e-05  1.606893e-05
>
> cat("\n")

> cat("correlation matrix 'corma'\n")
```

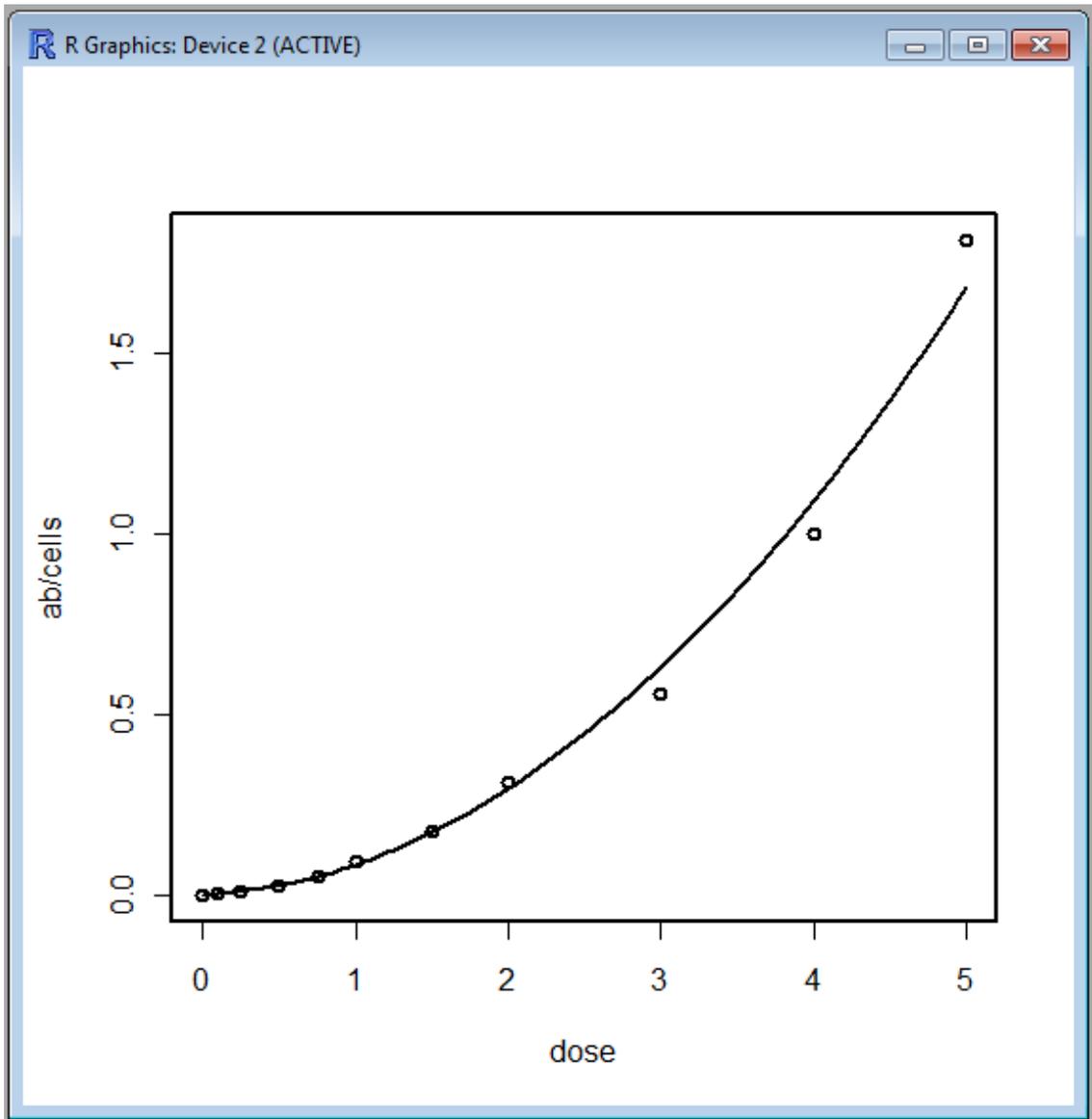


Fig. VI-1. Resultado obtenido con los datos de ^{60}Co presentado a modo de gráfico en el que se muestran los puntos de datos observados y la curva de ajuste lineal cuadrática.

Anexo VII

EJEMPLO DE EJERCICIO DE COMPARACIÓN ENTRE LABORATORIOS CON FINES DE GARANTÍA DE LA CALIDAD

En el presente anexo se da un ejemplo de comparación internacional realizado entre 14 laboratorios de dosimetría biológica. El ejercicio consistió en el análisis de preparaciones de metafases de sangre que había sido irradiada *in vitro* a 0,75 y 2,5 Gy con rayos γ de ^{60}Co . Se pidió a los laboratorios participantes que notificaran la frecuencia de dicéntricos que habían obtenido y la dosis estimada después de analizar 50 y 100 células (en modalidad de triaje) y después de un examen convencional de 500 células, o menos si llegaban antes a recontar 100 dicéntricos. En esta comparación entre laboratorios se evaluó el desempeño de cada centro y la reproducibilidad del ejercicio aplicando métodos robustos (algoritmos A y S), según se describen en las normas ISO 5725-5 e ISO 13528:2005 [15, 16].

En el presente anexo se muestra, a modo de ejemplo desarrollado, únicamente un subconjunto de los resultados de la comparación entre laboratorios, los obtenidos después de analizar 500 células a 0,75 Gy. Los pormenores completos se pueden consultar en [17].

Para determinar el desempeño de los laboratorios se utilizó la prueba de la z:

$$z = \frac{(x_i - x_{ref})}{\sqrt{(s^*)^2 + u_x^2}} \quad (\text{VII-1})$$

La prueba de la z considera los valores notificados por cada laboratorio para la frecuencia de dicéntricos observada o la dosis estimada, que se habrá derivado refiriendo la frecuencia de dicéntricos a la curva de dosis-respuesta propia del laboratorio (x_i). Para el análisis de la frecuencia, x_{ref} fue un valor de consenso (promedio robusto, x^* , obtenido con el algoritmo A), y para el análisis de la estimación de la dosis fue la dosis física administrada. La prueba de la z también tiene en cuenta la desviación estándar robusta (s^*) obtenida por el algoritmo A y la incertidumbre estándar del valor de consenso o de referencia (u_x). Cuando se evaluaron las frecuencias, u_x se calculó del modo siguiente:

$$u_{ref} = 1,25s^* / \sqrt{p} \quad (\text{VII-2})$$

donde p es el número de laboratorios participantes.

En lo que se refiere a la estimación de la dosis, la incertidumbre, designada por u_x , de las mediciones físicas de las dosis efectivamente administradas a las muestras de sangre se consideró despreciable de conformidad con los criterios que figuran en la ec. (VII-3).

$$0,96 \leq \frac{s^*}{\sqrt{(s^*)^2 + u_x^2}} \leq 1 \quad (\text{VII-3})$$

Para evaluar el desempeño de los laboratorios se aplicaron los criterios siguientes:

$ z \leq 2$	satisfactorio
$2 < z < 3$	dudoso
$ z \geq 3$	insatisfactorio

En lo que se refiere a la frecuencia de dicéntricos, el valor de z obtenido para cada laboratorio se muestra en la figura VII-1. En este caso, el promedio robusto utilizado como x_{ref} fue de 0,05, y s^* valía 0,01. Todos los valores de z se situaron entre -1,66 y 1,21 y, de conformidad con los criterios de aceptación, todos se consideraron “satisfactorios”.

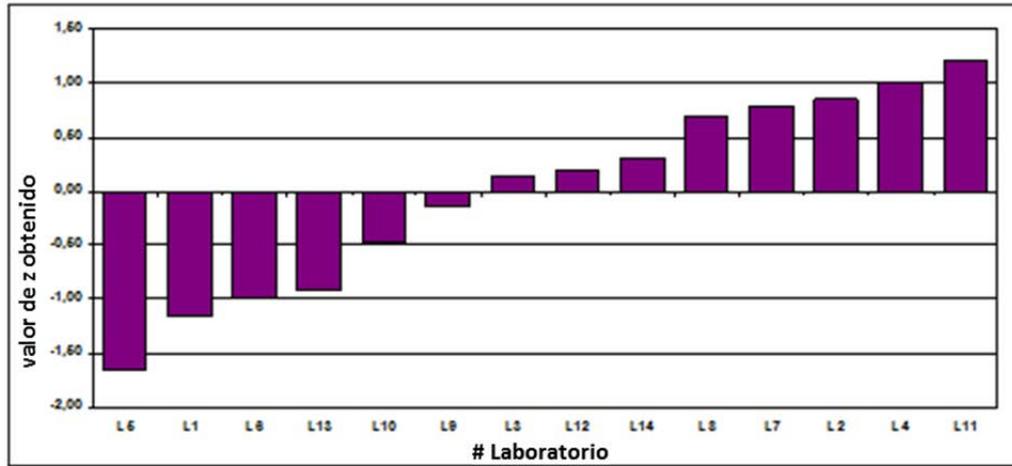


Fig. VII-1. Para la frecuencia de dicéntricos, valor de z obtenido para cada uno de los laboratorios participantes.

En la figura VII-2 se muestran, para cada laboratorio, las estimaciones de la dosis notificadas y los intervalos de confianza del 95 %. La línea horizontal continua representa la dosis física administrada y las líneas punteadas corresponden al intervalo de $1,96s^*$. En este caso, solo a L11, que notificó una dosis estimada de 0,98 Gy, le correspondió un valor de z que lo calificaba de “dudoso” (2.12).

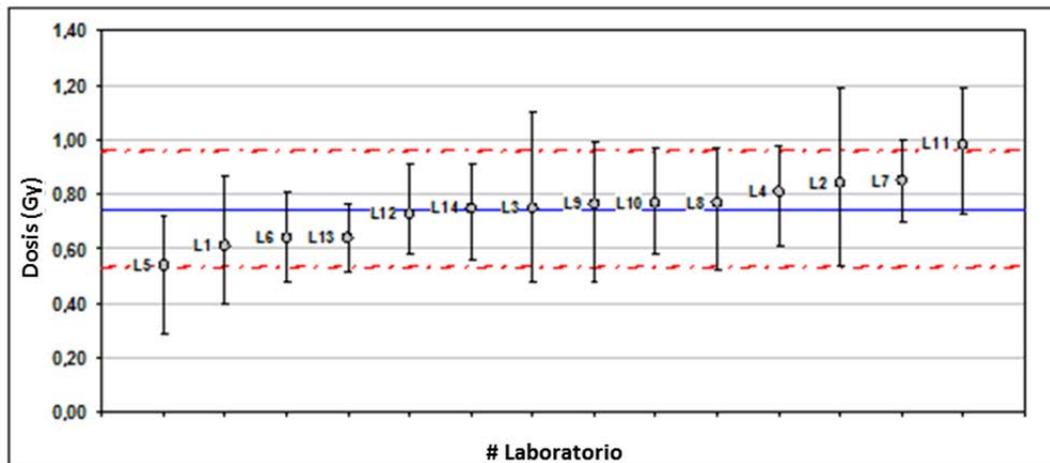


Fig. VII-2. Dosis estimada por cada uno de los laboratorios participantes.

La reproducibilidad del ejercicio se evaluó mediante la desviación estándar de la reproducibilidad (S_R):

$$S_R = \sqrt{(s^*)^2 + S_r^2 \left(1 - \frac{1}{n}\right)} \quad (\text{VII-4})$$

En esta fórmula se considera la variabilidad entre laboratorios mediante la desviación estándar robusta (s^*) obtenida con el algoritmo A y la variabilidad entre laboratorios mediante la desviación estándar de la repetibilidad (S_r) obtenida con el algoritmo S. En la ec. (VII-4), n

representa las mediciones duplicadas de cada laboratorio participante, que en el presente ejercicio fueron 2. Después de analizar 500 células a 0,75 Gy, los valores de S_R fueron de 0,013 para la frecuencia y 0,116 para la dosis. Para comparar la reproducibilidad de las dos mediciones, frecuencia y dosis, se definió el coeficiente de variación (CV).

El CV indica la dispersión general de los resultados y se calcula como la razón S_R/x^* . En el presente ejemplo se obtuvieron los coeficientes 24,4 % y 15,6 % para la frecuencia y la dosis, respectivamente. Los resultados indicaron que la reproducibilidad era mejor para las dosis que para las frecuencias de dicéntricos.

Las futuras comparaciones entre los mismos laboratorios determinarán si se puede mejorar la reproducibilidad. Si no se puede mejorar, entonces el valor obtenido se aceptará a modo de variabilidad asociada a los errores aleatorios del método.

REFERENCIAS DE LOS ANEXOS

- [1] FENECH, M., Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 1084–1104.
- [2] WEIER, H.G., *et al.*, Two colour hybridization with high complexity chromosome-specific probes and a degenerate alpha satellite probe DNA allows unambiguous discrimination between symmetrical and asymmetrical translocations, *Chromosoma* **100** (1991) 371–376.
- [3] FENECH, M., *et al.*, HUMN project: detailed description of the scoring criteria 4686 for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte 4687 cultures, *Mutat. Res.* **534** (2003) 65–75.
- [4] EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., PURROT, R.J., Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution, *Radiat. Environ. Biophys.* **16** (1979) 89–100.
- [5] MERKLE, W., Poisson goodness-of-fit tests for radiation-induced chromosome aberrations, *Int. J. Radiat. Biol.* **40** (1981) 685–692.
- [6] FROME, E.L., DUFRAIN, R.J., Maximum likelihood estimation for cytogenetic dose-response curves, *Biometrics* **42** (1986) 73–84.
- [7] PAPWORTH, D.G., SAVAGE, J.R.K., “Curve fitting by maximum likelihood”, *Radiation-Induced Chromosomal Aberrations in Tradescantia: Dose Response Curves*, *Radiat. Bot.* **15** (1975) 87–140.
- [8] SASAKI, M.S., Chromosomal biodosimetry by unfolding a mixed Poisson distribution: a generalized model, *Int. J. Radiat. Biol.* **79** (2003) 83–97.
- [9] BRAME, R. S., and GROER, P. G., Bayesian methods for chromosome dosimetry following a criticality accident. *Radiat. Prot. Dosim.* **104** (2003) 61–63.
- [10] YONG, L.C., *et al.*, Increased frequency of chromosome translocations in airline pilots with long-term flying experience, *Occ. Environ. Med.* **66** (2008) 56–62.
- [11] NEYMAN, J., On a new class of “contagious” distribution, applicable in entomology and bacteriology, *Am. Math. Stat.* **10** (1939) 35–55.
- [12] MORAND, J., *et al.*, Confidence limits for Neyman type A-distributed events, *Radiat. Prot. Dosim.* **128** (2008) 437–443.
- [13] STIRATELLI, R.G., MCCARTHY, K.L., SCRIBNER, H.E., Parametric approaches to the analysis of in vivo cytogenetics studies, *Environ. Mutagen.* **7** Suppl. 4 (1985) S43–S54.
- [14] AITCHISON, J., SHEN, S.M., Logistic-normal distributions: some properties and uses, *Biometrika* **67** (1980) 261–272.
- [15] ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN, “Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición – Parte 5: Métodos alternativos para la determinación de la precisión de un método de medición normalizado” Norma española UNE 82009-5 (Norma Internacional ISO 5725-5), AENOR, Madrid (1999).
- [16] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN, Métodos estadísticos para utilizar en ensayos de aptitud mediante comparaciones interlaboratorio, Norma técnica colombiana, NTC 5755 (Norma Internacional ISO 13528), INCOTEC, Bogotá (2010).
- [17] DI GIORGIO, M., BARQUINERO, J.F., VALLERGA, M.B., RADL, A., TAJA, M.R., SEOANE, A., DE LUCA, J., STUCK OLIVEIRA, M., VALDIVIA, P., GARCIA LIMA, O., LAMADRID, A., GONZALEZ MESA, J., ROMERO AGUILERA, I., MANDINA CARDOSO, T., GUERRERO CARBAJAL, Y.C., ARCEO MALDONADO, C., ESPINOZA, M.E., MARTINEZ-LOPEZ, W., MENDEZ-ACUÑA, L., DI TOMASO, M., ROY, L., LINDHOLM, C., ROMM, H., GÜÇLÜ, I., LLOYD, D.C., Biological dosimetry intercomparison exercise: an evaluation through triage and routine mode results by robust methods. *Radiation Research* (2011, in press).

LISTA DE SIGLAS

ace	fragmento acéntrico
ADN	ácido desoxirribonucleico
AFRRI	Armed Forces Radiobiology Research Institute (Estados Unidos de América)
ANOVA	análisis de la varianza
ARNasa	ribonucleasa
AS	puntos sin base
ATP	trifosfato de adenosina
BD	daño en las bases
BER	reparación por excisión de pares de bases
BN	célula binucleada
BrdU	bromodesoxiuridina
BSS	Normas básicas de seguridad
CABAS	programa informático para el cálculo de las aberraciones cromosómicas
CBMN	prueba de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis
CBMN Cyt	prueba de micronúcleos y citoma con bloqueo de la citocinesis
CC	control de calidad
CCD	dispositivo de carga acoplada
CHO	ovario de hámster chino
CP	sonda centromérica
Cyt-B	citocalasina B
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindol
DCA	prueba de cromosomas dicéntricos
DDR	dispositivo de dispersión radiactiva
DER	dispositivo de exposición radiactiva
df	grados de libertad
dic	cromosoma dicéntrico

DMSO	dimetil sulfóxido
DNI	dispositivo nuclear improvisado
DPC	entrecruzamientos entre ADN y proteínas
DSB	rotura bicatenaria
DTL	dosímetro de termoluminiscencia
EBR	eficacia biológica relativa
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ESR	resonancia de espín electrónico
FISH	hibridación in situ con sondas fluorescentes
FPG	fluorescencia más Giemsa
GC	garantía de calidad
HBSS	solución salina equilibrada de Hank
HPBL	linfocitos humanos de sangre periférica
HRR	reparación por recombinación homóloga
HUMN	micronúcleo humano
ICRP	Comisión Internacional de Protección Radiológica
ICRU	Comisión Internacional de Unidades y Medidas Radiológicas
IRSN	Instituto de Radioprotección y Seguridad Nuclear
ISO	Organización Internacional de Normalización
LCL	límite de confianza inferior
LIMS	sistema de gestión de la información de laboratorio
M1, M2, ...	metafase de la primera, segunda, ... división <i>in vitro</i>
MDS	sitios con daños múltiples
MEM	medio de cultivo esencial mínimo
mFISH	hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes de varios colores
MN	micronúcleo
MNCM ^{-ve/+ve}	célula con micronúcleo con (+) o sin (-) centrómero

NBUD	protuberancia nuclear
NDI	índice de división nuclear
NER	reparación por excisión de nucleótidos
NHEJ	unión de extremos no homólogos
NIRS	Instituto Nacional de Ciencias Radiológicas (Japón)
NPB	punto nucleoplásmico
NPP	central nuclear de potencia
NU	Naciones Unidas
OA	ácido okadaico
OIEA	Organismo Internacional de Energía Atómica
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAINT	Protocolo para la identificación de aberraciones y terminología de nomenclaturas
PBS	solución salina tamponada con fosfato
PCC	condensación prematura de cromosomas
PCI	proyecto coordinado de investigación
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	macrogol
PHA	fitohemaglutinina
REAC/TS	Radiation Emergency Assistance Center/Training Site (EE.UU.)
RICA	prueba rápida de cromosomas interfásicos
SAR	síndrome agudo por radiación
SD	desviación estándar
SE	error estándar
SEM	error estándar de la media
SI	Sistema Internacional de unidades
SSB	rotura monocatenaria
SSBR	reparación de rotura monocatenaria

SSC	solución de cloruro y citrato sódico
TLE	transferencia lineal de energía
UCL	límite de confianza superior
UI	unidad internacional
UV	ultravioleta
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana

DEFINICIONES³

aberración estable. Reordenación o intercambio cromosómicos no mortales entre cromosomas o dentro de ellos, sin pérdida de material genético, que se produce durante la mitosis.

aberración inestable. Reordenación cromosómica de una célula que puede ser letal para ella misma o para sus células hijas por dar lugar a la pérdida de material genético o a una transmisión desequilibrada de material genético durante la mitosis.

accidente*. Todo suceso involuntario, incluidos los errores de operación, fallos de equipo u otros contratiempos, cuyas consecuencias reales o potenciales no sean despreciables desde el punto de vista de la protección o seguridad tecnológica.

accidente de criticidad. Accidente en el que se produce criticidad.

- Por regla general, en una instalación en la que se utiliza material fisible.

acéntrico (ace). Fragmento cromosómico terminal o intersticial de tamaño diverso que carece de centrómero. Los acéntricos formados con independencia de aberraciones dicéntricas o tricéntricas o anillos céntricos se denominan acéntricos en exceso.

ácido desoxirribonucleico (ADN). Molécula contenida en los cromosomas donde están codificados los genes responsables de la estructura y la función de un organismo y que hace posible la transmisión de la información genética de una generación a la siguiente.

actividad mínima detectable. Dosis que corresponde a la frecuencia más baja de un marcador biosimétrico dado que se puede distinguir por encima de la frecuencia de fondo con un determinado nivel de confianza, por regla general del 95 %.

agua tritiada. Forma de agua en la que los átomos de hidrógeno ordinarios han sido sustituidos por átomos de tritio, un isótopo radiactivo del hidrógeno.

ajuste de la curva. Determinación de una ecuación que describa el mejor ajuste a una serie de puntos de datos, posiblemente con cierto número de otras restricciones, en particular la ponderación del ajuste en función de la fiabilidad de los puntos de datos (evaluados por el error estándar en el punto) y/o restringiendo el ajuste a un valor de referencia medido.

aneuploidógeno. Mutágeno indirecto capaz de afectar a la división celular y al huso mitótico provocando la pérdida o ganancia de cromosomas enteros y, de ese modo, inducir una aneuploidía.

anillo, céntrico/acéntrico. Cromosoma circular aberrante que contiene un centrómero, o carece de él, como consecuencia de la unión de dos puntos de rotura en el interior de un cromosoma.

anticoagulante. Fármaco que impide la coagulación de la sangre.

³ Las definiciones son pertinentes a los efectos de la presente publicación. Las definiciones señaladas con un asterisco se han tomado de la ref. [357].

bandeo C. Véase “bandeo cromosómico”.

bandeo cromosómico Técnica de tinción diferencial de los cromosomas en la que por regla general se utiliza el colorante de Giemsa. Según el método utilizado aparecen teñidas de forma selectiva determinadas regiones cromosómicas tales como los centrómeros (bandeo C) o se distinguen pautas características en los brazos (bandeo G). La pauta de bandas oscuras y claras, que es exclusiva de cada pareja de cromosomas, se utiliza para identificarlos y evaluar su estructura.

bandeo G Véase “bandeo cromosómico”.

becquerel (Bq)*. Unidad de actividad del SI, igual a una transformación por segundo.

- Sustituye al curio (Ci), que no es una unidad del SI. $1 \text{ Bq} = 27 \text{ pCi}$ ($2,7 \times 10^{-11} \text{ Ci}$) aproximadamente. $1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq}$.

binucleado. Que tiene dos núcleos. Las células binucleadas se forman al final del ciclo de división nuclear y se pueden acumular mediante un inhibidor de la citocinesis tal como la citocalasina B. En la prueba de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis se determina la presencia de micronúcleos y puentes nucleoplásmicos en las células binucleadas.

biomarcador. Indicador de procesos biológicos normales o patógenos. En el ámbito de la dosimetría biológica se utilizan para distinguir las lesiones biológicas inducidas por las radiaciones de las provocadas por otros agentes.

Bragg-Gray, teoría de la cavidad de. Relaciona la ionización producida en el interior de una cavidad repleta de gas contenida en un medio respecto de la energía absorbida en ese medio continente. En el contexto de la formación de aberraciones cromosómicas, la aplicación de la teoría significa que el tamaño del núcleo celular es tan pequeño que el total de energía absorbida se debe únicamente a los electrones que atraviesan el núcleo. Por consiguiente, las partículas secundarias se pueden despreciar.

5-bromodesoxiuridina (BrdU). Análogo de la timidina en el que el grupo metilo que ocupa la posición 5' en la timina ha sido sustituido por bromo. La BrdU se utiliza en dosimetría biológica para marcar el ADN recién sintetizado y así identificar las células que han atravesado el proceso de mitosis más de una vez.

cadena de custodia. Historial completo de una muestra de sangre que abarca su manejo y almacenamiento desde el punto de obtención u recepción de la muestra hasta su disposición final.

capa leucocitaria. Fracción que en una muestra sanguínea anticoagulada y sometida a centrifugación contiene la mayor parte de los leucocitos.

cariotipo. Ordenación sistemática de las parejas de cromosomas homólogos de una misma célula en función del tamaño, posición del centrómero y patrón de bandas de conformidad con una clasificación estándar.

célula estable. Célula que carece de aberraciones inestables. Puede que no presente lesiones en absoluto o que contenga únicamente aberraciones estables.

célula inestable. Célula que presenta una aberración inestable tal como un cromosoma dicéntrico o en anillo o un fragmento acéntrico.

centrómero. Constricción primaria de los cromosomas que se visualiza durante la mitosis y donde se reúne el par de cromátidas.

citocalasina B. Compuesto natural de origen fúngico que tiene la propiedad singular de inhibir la citocinesis en las células de mamíferos y humanos y se utiliza en la prueba de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.

citogenética. Rama de la genética que se ocupa del estudio de los cromosomas.

clastógeno. Agente físico o químico que rompe el ADN de los cromosomas y provoca reordenaciones como las aberraciones que se observan en la metafase.

colchicina/Colcemid. Compuestos alcaloides que inhiben la formación del huso durante la división celular. Se utilizan para obtener un gran número de células en la metafase, al impedir que pasen a la anafase. El Colcemid es un análogo sintético de la colchicina natural, de origen vegetal.

confianza, intervalo de. Intervalo calculado para una variable de interés, por ejemplo, una tasa, obtenido según una distribución de elección (por ejemplo, la de Poisson) de tal modo que se dé una determinada probabilidad de que en él figure el valor verdadero de la variable. Por consiguiente, el intervalo de confianza (descrito por los límites de confianza superior e inferior) se utiliza para indicar la fiabilidad de una estimación. La probabilidad de que el intervalo contenga el parámetro está determinada por el nivel de confianza, o coeficiente de confianza. Si se aumenta el nivel de confianza deseado se amplía el intervalo de confianza.

confundir. “Entorpecer” una variable (variable de confusión, por ejemplo, la edad o el tabaquismo) la correlación entre la variable de la influencia (por ejemplo, la exposición a una radiación ionizante) y el efecto (por ejemplo, las aberraciones inducidas) investigado en un estudio. Si no se tienen en cuenta los factores de confusión, puede que se suponga la existencia de una correlación que en la realidad no se da, o se difumine una correlación que sí existe.

contaminación*. Presencia de sustancias radiactivas sobre superficies, o dentro de sólidos, líquidos o gases (incluido el cuerpo humano), donde tal presencia no es ni intencionada ni deseable, o proceso que provoca la presencia de sustancias radiactivas en dichos lugares.

covarianza. Medida de la correlación de la varianza entre dos (o más) conjuntos de datos dependientes; en otras palabras, modo en que los datos varían conjuntamente. Puede ser positiva o negativa, lo que indica, respectivamente, una relación lineal positiva o negativa entre los conjuntos de datos. Si los datos son independientes, la covarianza es nula.

covarianza de los parámetros de una curva. Los parámetros (C, alfa, beta) no se desvían de forma independiente de sus valores idealmente verdaderos (véanse desviación estándar, varianza) sino que lo hacen conjuntamente hasta una determinada cantidad de correlación, puesto que se calculan simultáneamente a partir del mismo conjunto de datos. Por consiguiente, en los cálculos combinados como los de la ec. (7) el término del error es menor que cuando se calcula solo con las

varianzas. Se podrían calcular también las correlaciones correspondientes a partir de las varianzas y covarianzas (la covarianza dividida por la raíz cuadrada del producto de las dos varianzas, es decir, la covarianza dividida por el producto de las desviaciones estándar).

cromosoma arlequinado. Cromosoma que se ha marcado y teñido de manera diferenciada por haber fijado BrdU durante dos ciclos de replicación. Después de la tinción apropiada, una de las cromátidas aparece oscura y la otra clara.

curva de calibración. En dosimetría biológica, descripción gráfica o matemática de la relación entre la dosis y el efecto obtenida irradiando *in vitro* muestras de sangre con dosis conocidas. La curva se utiliza para determinar por interpolación la dosis de radiación absorbida por un individuo potencialmente expuesto.

desviación estándar (SD). Medida cuantitativa de la cantidad de variación que presenta una muestra de mediciones de una población, indicativa de la dispersión de los valores del conjunto de datos. Para los datos que se aproximan a una distribución normal, la desviación estándar de un parámetro de la curva indica la distancia a la que es probable que se encuentre del valor verdadero, que puede representarse idealmente como dado por la media de una población de gran tamaño de donantes (o experimentos) de calibración, basados cada uno de ellos en un gran número de células. Véase también “covarianza”.

dicéntrico (dic). Cromosoma aberrante que tiene dos centrómeros como consecuencia del fallo de la reparación de dos cromosomas rotos.

diploide. Número de cromosomas de las células somáticas, que es característico de la especie; en el ser humano: 46 (22 pares de autosomas y dos cromosomas sexuales).

dosimetría biológica/biodosimetría. Uso de biomarcadores para determinar la exposición a radiaciones y calcular la dosis absorbida.

dosímetro de radiación. Dispositivo físico que mide la exposición a la radiación ionizante.

dosímetro de termoluminiscencia (DLT). Tipo de dosímetro físico que se utiliza para medir la exposición a la radiación ionizante.

dosímetro OSL (luminiscencia estimulada ópticamente). Tipo de dosímetro físico que se utiliza para medir la exposición a la radiación ionizante.

dosis absorbida (D)*. Magnitud dosimétrica fundamental D , definida como:

$$D = \frac{d\bar{\varepsilon}}{dm}$$

donde:

$d\varepsilon$ es la energía media impartida por la radiación ionizante a la materia en un elemento de volumen, y dm es la masa de la materia del elemento de volumen.

- Se puede promediar la energía con respecto a cualquier volumen definido, siendo la dosis media igual a la energía total impartida en el volumen dividida por la masa del volumen.
- La dosis absorbida se define en un punto.
- Unida: gray (Gy), equivalente a 1 J/kg (anteriormente se empleaba el rad).

efecto determinista. Efecto de la radiación en la salud para el que suele existir un nivel umbral de la dosis por encima del cual la gravedad del efecto es mayor a medida que aumenta la dosis. El efecto se considera “efecto determinista grave” si es mortal o potencialmente mortal o provoca lesiones permanentes que disminuyen la calidad de vida.

efecto estocástico (de la radiación). Efecto en la salud, inducido por la radiación, cuya probabilidad de darse aumenta al incrementar la dosis de radiación, y cuya gravedad (cuando se produce) es independiente de la dosis. Los efectos estocásticos pueden ser somáticos o hereditarios y por lo general se producen sin un nivel de dosis umbral. Ejemplos de efectos estocásticos son el cáncer tiroideo y la leucemia.

efectos biológicos. Variedad de posibles consecuencias en materiales vivos, organismos, tejidos o células que, en función del tipo y el grado de daño celular, pueden resultar de la exposición a un agente externo tal como la radiación ionizante.

eficacia biológica relativa (EBR)*. Medida relativa de la eficacia de diferentes tipos de radiación para inducir un determinado efecto en la salud, expresada como la razón inversa de las dosis absorbidas de dos tipos de radiación diferentes que produjeran el mismo grado de un punto final biológico definido.

emergencia*. Situación no ordinaria que requiere la pronta adopción de medidas, principalmente para mitigar un peligro o las consecuencias adversas para la salud y la seguridad humanas, la calidad de vida, los bienes o el medio ambiente. Esto incluye las emergencias nucleares y radiológicas y las emergencias convencionales, como los incendios, las emisiones de productos químicos peligrosos, las tormentas o los terremotos. Se incluyen también las situaciones que exigen la pronta adopción de medidas para mitigar los efectos de un peligro percibido. Emergencia nuclear o radiológica. Emergencia en la que existe o se percibe un peligro causado por lo siguiente:

a) la energía derivada de una reacción nuclear en cadena o del decaimiento de los productos de una reacción en cadena; o bien

b) la exposición a la radiación.

- Los puntos a) y b) representan aproximadamente una emergencia nuclear y una emergencia radiológica, respectivamente. De todos modos, no se trata de una distinción exacta.
- En algunos casos, la expresión emergencia radiológica se utiliza cuando no importa distinguir explícitamente la naturaleza del peligro (por ejemplo, plan nacional de emergencia radiológica), y tiene esencialmente el mismo significado.

enzima. Molécula de proteína que cataliza las reacciones químicas de otras sustancias sin que, una vez completadas las reacciones, haya sido destruida o alterada.

epidemiología. Estudio de la distribución y los determinantes de los estados o eventos relacionados con la salud que afectan a una determinada población, y aplicación de ese estudio al control de los problemas de salud.

equilibrio de partículas cargadas. Se produce cuando el número de cada uno de los tipos de partículas cargadas que salen de un volumen dado es igual al de las que entran en él.

error estándar de la media (SEM). Medida cuantitativa de la cantidad de variación presente en una muestra de mediciones de una población que se aproxima a la normal, indicativa de la distancia a la que la media de las muestras es probable que se encuentre de la verdadera media de la población, por lo que cuantifica la exactitud con la que se conoce la verdadera media de la población.

espondilolartrosis anquilosante. Artritis crónica que afecta a la columna vertebral y las articulaciones sacroilíacas de la pelvis. Hace muchos decenios, en el tratamiento de las inflamaciones de la columna vertebral de esos pacientes se utilizaba la teleterapia de gran campo.

exposición*. Acto o situación de estar sometido a irradiación.

El término exposición no debería emplearse como sinónimo de dosis. Dosis es una medida de los efectos de la exposición.

- La exposición puede dividirse en categorías según su naturaleza y duración (véase “exposición, situaciones”) o según la fuente de exposición, las personas expuestas y/o las circunstancias en las cuales se da la exposición.

exposición externa. Exposición a la radiación de una fuente situada fuera del cuerpo.

- Se contrapone a la exposición interna.

exposición interna. Exposición a la radiación de una fuente situada dentro del cuerpo.

- Se contrapone a la exposición externa.

exposición, situaciones*.

exposición aguda. Exposición durante un periodo de tiempo breve. Por regla general se refiere a la exposición de una duración suficientemente breve para que las dosis resultantes se puedan considerar instantáneas (por ejemplo, menos de una hora).

exposición crónica. Exposición persistente en el tiempo. El adjetivo “crónico” se refiere sólo a la duración de la exposición, y no guarda relación alguna con la magnitud de las dosis de que se trate. Se emplea normalmente para referirse a exposiciones que se prolongan durante muchos años como consecuencia de la presencia de radionucleidos de larga vida en el medio ambiente. La Comisión Internacional de Protección Radiológica emplea la expresión exposición prolongada para describir el mismo concepto. Ambos términos se contraponen a exposición aguda.

falso negativo. Resultado de una prueba que indica que un individuo no está afectado cuando en realidad sí lo está; es decir, resultado negativo de una prueba para un individuo afectado.

falso positivo. Resultado de una prueba que indica que un individuo está afectado cuando en realidad no lo está; es decir, resultado positivo de una prueba para un individuo que verdaderamente no está afectado.

fluorocromo. Moléculas que emiten fluorescencia cuando se las excita apropiadamente. Se utilizan en la prueba citogenética FISH para destacar regiones cromosómicas específicas.

frecuencia/nivel/valor de fondo. Incidencia (o número) de aberraciones cromosómicas o micronúcleos registrados en la población general.

función G Factor cronodependiente utilizado para modificar el coeficiente del cuadrado de la dosis en la relación lineal cuadrática entre la dosis y la respuesta para tener en cuenta los efectos de la prolongación de la dosis.

genotoxina. Todo agente químico o físico que provoque daños o mutaciones en el material genético.

gray (Gy)*. Unidad del SI de kerma y de dosis absorbida, igual a 1 J/kg. Sustituye al rad. 1Gy = 100 rad.

grupo de control. Grupo de células, animales o personas objeto de la prueba que se exponen a unas condiciones lo más idénticas posible a las de los individuos expuestos, salvo en que no se les administra el efecto que se está investigando.

hematopoyesis. Formación de componentes celulares de la sangre.

hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH). Técnica utilizada para determinar la presencia de cromosomas o regiones cromosómicas concretas mediante la unión de sondas de ADN marcadas con fluorescencia a ADN cromosómico desnaturalizado.

FISH en interfase. Se introducen sondas directamente en la célula cuando está en la interfase. De ese modo se pueden visualizar los cambios producidos a nivel de dominios cromosómicos.

FISH en metafase. Se introducen sondas en cromosomas que se encuentran en la metafase. De ese modo se pueden visualizar las aberraciones cromosómicas.

técnicas FISH:

FISH multicolor (mFISH). En la mFISH se utilizan sondas de ADN que “pintan” los cromosomas enteros, marcándolos con una combinación de colores fluorescentes propia para cada uno de los cromosomas humanos.

pq-mFISH. Variante de la mFISH en la que se pueden distinguir los brazos de los cromosomas.

incorporación. Entrada de un radionucleido en el cuerpo por inhalación, ingestión o a través de la piel intacta o lesionada.

índice de división nuclear (NDI). Medida de la velocidad promedio con que se producen ciclos celulares, tomada a partir del número relativo de células de una población que han llegado a las fases sucesivas de la división, por regla general hasta la cuarta división.

índice mitótico. Porcentaje de células que se encuentran en mitosis en un momento dado.

inserción. Anormalidad cromosómica en la que un fragmento acéntrico de un cromosoma se ha insertado en el brazo de otro cromosoma.

intercomparación, ejercicio de Procedimiento utilizado para la garantía y el control de la calidad. En dosimetría biológica se intercambian materiales entre laboratorios para realizar análisis comparativos.

interfase. Período del ciclo celular entre divisiones mitóticas en el que la célula pasa la mayor parte del tiempo y lleva a cabo la mayoría de sus funciones, tales como la preparación para la división celular.

inversión. Reordenación cromosómica en la que un segmento de un cromosoma se ha invertido enteramente y se ha reinsertado en el mismo punto de rotura. Puede ser pericéntrica o paracéntrica, según si el centrómero está incluido o no en la inversión, respectivamente.

in vitro. Observado o realizado en el tubo de ensayo.

in vivo. Observado o realizado en el organismo vivo.

ionización. Proceso físico por el cual uno o más electrones orbitales son expulsados de un átomo o molécula, pasando estos últimos a un estado dotado de carga eléctrica (un ion). El proceso provoca la liberación localizada de una gran cantidad de energía, aproximadamente 33eV por cada ionización, más que suficiente para romper un enlace químico fuerte.

isótopos. Átomos del mismo elemento químico, que poseen el mismo número de protones (igual número atómico pero distinto número nuclear) y de electrones pero distinto número de neutrones. Los isótopos son un mismo elemento químico pero poseen características nucleónicas distintas.

kerma en aire (energía cinética transferida a la materia)*. La cantidad K , se define como:

$$K = \frac{dE_{tr}}{dm}$$

donde:

dE_{tr} es la suma de las energías cinéticas iniciales de todas las partículas ionizantes cargadas emitidas por las partículas ionizantes no cargadas del material de masa dm .

- Unidad: gray (Gy).
- Originalmente era el acrónimo de “kinetic energy released in matter” pero en la actualidad se acepta como término.

laboratorio de servicio. En el contexto de esta publicación, laboratorio especializado dedicado a realizar mediciones de dosimetría biológica.

lesión del ADN en racimo. Más de dos puntos de daño del ADN provocados por radiaciones ionizantes en un segmento de no más de 20 pares de bases de una misma molécula.

leucocito. Término general con el que se describen todos los tipos de células blancas sanguíneas (por ejemplo, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células plasmáticas y monocitos).

linfocito. Tipo de leucocito que se encuentra principalmente en la sangre, la linfa y los tejidos linfáticos y que da lugar a las células del organismo dotadas de competencia inmunológica y a sus precursores.

maniquí. Dispositivo que absorbe y dispersa la radiación gamma y X aproximadamente igual que lo hacen los tejidos del cuerpo (por ejemplo, para mediciones dosimétricas o irradiación de muestras sanguíneas necesarias para obtener una curva de calibración dosis-respuesta).

metaanálisis. Estudios en los que se reúnen, resumen y evalúan según determinados parámetros los resultados de investigaciones similares e independientes sobre un mismo tema.

metafase. Fase de la mitosis del ciclo de las células eucariotas en la que los cromosomas están condensados en su longitud mínima y se alinean en el centro de la célula antes de separarse en las dos células hijas.

método Qdr. Análisis matemático de las frecuencias de anillos céntricos y cromosomas dicéntricos mediante el cual se puede evaluar la dosis cuando se sospecha que ha habido una exposición parcial del cuerpo. Mediante este método se puede evaluar la dosis examinando la distribución de los dicéntricos y anillos únicamente entre las células dañadas. Véase también “Poisson contaminado, método de”.

método Qpcc. Análisis matemático idéntico al Qdr (*supra*) pero basado en la distribución de fragmentos cromosómicos condensados prematuramente.

micronúcleo (MN). Pequeño núcleo adicional que se encuentra en las células que han sufrido daño cromosómico. Ordinariamente, los MN se forman al quedar rezagado un cromosoma entero o un fragmento de cromosoma acéntrico en la anafase. El diámetro de los MN suele ser de entre 1/16 y un 1/3 del tamaño de los núcleos principales de las células mononucleadas o binucleadas. Los MN presentan la misma textura y las mismas propiedades de tinción que los núcleos.

mitógeno. Reactivo que induce la proliferación celular.

mitosis. Parte del proceso de división celular en la que las células eucariotas separan sus cromosomas en dos conjuntos idénticos.

modelo lineal. Modelo matemático común utilizado para describir la respuesta biológica a la radiación, en el que el efecto Y es una función lineal de la dosis D :

$$Y = \alpha D.$$

modelo lineal cuadrático. Modelo matemático común utilizado para describir la respuesta biológica a la radiación, en el que el efecto Y es una función lineal cuadrática de la dosis D :

$$Y = \alpha D + \beta D^2.$$

mutágeno. Todo agente químico o físico que presente la propiedad de inducir mutaciones genéticas en la secuencia de bases de la molécula de ADN o a escala de organización cromosómica.

mutación. Toda alteración que sufra un gen respecto de su estado natural; puede ser patógena o una variante benigna normal.

neutrones de fisión. Neutrones libres, usualmente producidos durante una fisión nuclear, reacción nuclear en la cual un núcleo pesado de un átomo se divide en dos partes aproximadamente iguales (los núcleos de elementos más ligeros), que va acompañada de la liberación de una cantidad relativamente grande de energía.

neutrones rápidos. Neutrones cuya energía supera un determinado nivel arbitrario, usualmente alrededor de 1 MeV.

nucleosoma. Estructuras que forman las unidades fundamentales repetitivas del empaquetamiento de la cromatina eucariótica en el interior de los cromosomas.

nucleido. Tipo de átomo caracterizado por su número de protones (número atómico) y número nuclear.

PAINT (protocolo para la identificación de aberraciones y terminología de nomenclaturas). Terminología utilizada en el análisis FISH para describir las aberraciones cromosómicas.

período de semidesintegración ($T_{1/2}$)*.

1) En el caso de un radionucleido, tiempo necesario para que su actividad se reduzca a la mitad por un proceso de desintegración radiactiva.

- Cuando sea necesario establecer una diferencia con otros períodos de semidesintegración (véase 2)), se debería emplear la expresión período de semidesintegración radiactiva.
- El período de semidesintegración se relaciona con la constante de desintegración, λ , mediante la expresión:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$$

2) Tiempo necesario para que una cantidad de un determinado material (por ejemplo, un radionucleido) presente en un lugar especificado se reduzca a la mitad como resultado de cualesquiera proceso o procesos especificados que sigan pautas exponenciales similares al decaimiento radiactivo.

período de semieliminación biológica. Tiempo necesario para que una cantidad de material en un tejido, órgano o región específicos del cuerpo (o de cualquier otra biota especificada) se reduzca a la mitad como resultado de procesos biológicos.

período de semidesintegración efectiva (T_{eff}). Tiempo necesario para que la actividad de un radionucleido presente en un lugar especificado se reduzca a la mitad como resultado de todos los procesos pertinentes.

$$\frac{1}{T_{eff}} = \sum_i \frac{1}{T_i}$$

donde:

T_i es el período de semidesintegración para el proceso i .

período de semidesintegración radiactiva. En el caso de un radionucleido, tiempo necesario para que su actividad se reduzca a la mitad por un proceso de desintegración radiactiva.

Poisson contaminado, método de. Análisis matemático de las frecuencias de anillos céntricos y cromosomas dicéntricos mediante el cual se puede evaluar la dosis cuando se sospecha que ha habido una exposición parcial del cuerpo. Para evaluar la dosis con ese método se considera la distribución de los cromosomas dicéntricos en el total de células recontadas; además, el método informa sobre del volumen de cuerpo irradiado. Véase también “método Qdr”.

primeros actuantes*. Primeros agentes de un servicio de emergencia en dar respuesta a una emergencia en el lugar donde se produce.

protuberancia nuclear. Cuerpo similar a un micronúcleo que se une al núcleo por una delgada conexión nucleoplásmica; anormalidad nuclear.

prueba de micronúcleos y citoma con bloqueo de la citocinesis (CBMN Cyt). La prueba CBMN Cyt es una versión más avanzada de la prueba CBMN en la que se mide una variedad más amplia de biomarcadores de lesión cromosómica (micronúcleos, puentes nucleoplásmicos, protuberancias nucleares en células binucleadas) así como la muerte celular (células necróticas y apoptóticas) y la citostasis (índice de división nuclear sobre la base de las proporciones de células mononucleadas, binucleadas y multinucleadas). Los micronúcleos y los puentes nucleoplásmicos son los biomarcadores de este sistema mejor validados para la dosimetría biológica de la exposición a radiaciones ionizantes.

punte nucleoplásmico (NPB). Se produce cuando los centrómeros de las cromátidas o los cromosomas dicéntricos son arrastrados hacia los polos opuestos de la célula en la anafase. En la prueba CBMN se observan células binucleadas con NPB porque se ha inhibido la citocinesis, lo que impide que se rompan los puentes anafásicos a partir de los cuales se forman los puentes nucleoplásmicos.

radiación alfa. Radiación de partículas emitida en la desintegración nuclear de determinados radionucleidos. Las partículas alfa están compuestas por dos neutrones y dos protones y son idénticas al núcleo del átomo de helio. Unos pocos centímetros de aire las absorben rápidamente, por lo que el peligro principal procede de los nucleidos incorporados internamente que emitan partículas alfa.

radiación beta. Radiación de partículas formada por electrones con carga positiva o negativa emitidos en la desintegración nuclear de determinados radionucleidos. Las partículas beta penetran en el aire desde unos pocos centímetros hasta varios metros, y en los tejidos blandos y en el plástico desde unos pocos milímetros hasta varios centímetros.

radiación de alta densidad de ionización/de alta transferencia lineal de energía. Radiación que deposita su energía en interacciones muy próximas a lo largo de su trayectoria (por ejemplo, partículas alfa y neutrones). La distribución espacial se plasma en la eficacia biológica relativa. Véase también “transferencia lineal de energía (TLE)”.

radiación de baja densidad de ionización/de baja transferencia lineal de energía. Véanse ‘radiación de alta densidad de ionización/de alta transferencia lineal de energía’ y ‘transferencia lineal de energía’.

radiación de neutrones. Los neutrones, uno de los componentes del núcleo atómico, son partículas elementales eléctricamente neutras. Se emiten en particular durante la fisión nuclear y tienen una alta capacidad de penetración.

radiación gamma. Radiación electromagnética (fotones) de alta frecuencia (longitud de onda muy corta) emitida por el núcleo o por el decaimiento de una partícula o cuando se produce una aniquilación. Los rayos gamma penetran en el tejido más profundamente que las partículas beta o las partículas alfa, pero su transferencia lineal de energía es más baja. Para el blindaje frente a la radiación gamma hay que utilizar materiales pesados tales como el plomo o el cemento.

radiación X. Radiación electromagnética (fotones) de onda corta emitida por electrones que se encuentran en orbitales externos al núcleo o que son acelerados para producir radiación del tipo de la de frenado. Su longitud de onda es más corta que la de los rayos UV y más larga que la de los rayos gamma. Para el blindaje frente a los rayos X hay que utilizar materiales pesados tales como el plomo o el cemento.

razón de posibilidades. Cociente de dos posibilidades, calculado para mostrar la probabilidad de una dosis nula frente a una dosis supuesta (por ejemplo, de un dosímetro personal) u obtenida por medición física.

reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Procedimiento para amplificar enzimáticamente secuencias de ADN mediante repeticiones repetidas por medio de la ADN-polimerasa.

reordenación compleja. Aberración que entraña tres o más roturas en dos o más cromosomas y que de forma característica se induce después de la exposición a radiaciones de alta densidad de ionización o a dosis altas de radiaciones de baja densidad de ionización.

resonancia de espín electrónico (ESR)/resonancia paramagnética electrónica (EPR) Técnica para el estudio de especies químicas que presentan uno o más electrones desapareados tales como los radicales libres orgánicos o inorgánicos o los complejos inorgánicos que poseen un ion de un metal de transición. Se puede utilizar como dosímetro de radiaciones.

roentgen (R)*. Unidad de exposición, igual a $2,58 \times 10^{-4}$ C/kg (exactamente).

- Sustituida por la unidad C/kg del SI.

rotura bicatenaria (DSB). Tipo de lesión del ADN; el ADN se rompe completamente debido a la escisión del esqueleto de enlaces fosfodiéster de las dos cadenas de la doble hélice en el mismo locus o en loci próximos.

rotura monocatenaria (SSB). Tipo de lesión del ADN en la que se rompe una sola de las cadenas de la doble hélice.

semitiempo. Tiempo necesario para que un parámetro disminuya al 50 % de su valor original. Aplicado en dosimetría biológica, el término se utiliza para describir la renovación de los linfocitos de la sangre periférica.

sesgo. Desviación de los resultados o deducciones respecto de la verdad, o procesos que conducen a esa desviación.

sievert (Sv)*. Unidad de dosis equivalente y de dosis efectiva del SI, igual a 1 J/kg.

significación estadística. Se habla de significación estadística cuando el resultado de un experimento o un estudio dados se desvían claramente del resultado previsto. La significación estadística del resultado de un experimento o un estudio dados es una estimación del grado en que es “verdadero”, es decir, está causado por algo que no es meramente el azar. En general, la desviación entre el resultado observado y el previsto se considera significativa si la probabilidad de error es inferior al 5 %.

sincronización. Aplicado al cultivo celular, el proceso se refiere a la manipulación de las células para que se encuentren en la misma fase del ciclo celular.

sonda pancentromérica. Sonda de ADN que marca la región del centrómero de todos los cromosomas.

tasa de dosis. Medida de la tasa a la cual la energía se transfiere de la radiación a la diana; dosis proporcionada por unidad de tiempo. Aunque en principio la tasa de dosis se podría definir respecto de cualquier unidad de tiempo (por ejemplo, una dosis anual es técnicamente una tasa de dosis), habitualmente la expresión tasa de dosis se utiliza para periodos de tiempo breves, por ejemplo, dosis por segundo o dosis por hora.

telómero. Extremo de los brazos cromosómicos formado por repeticiones en tándem de la secuencia TTAGGG que impiden las fusiones cromosómicas y la formación de cromosomas dicéntricos. Las secuencias teloméricas se pueden perder en los ciclos de replicación del ADN o si se producen microsupresiones en la secuencia.

transferencia lineal de energía (TLE) (L_{Δ})*. En general se define por:

$$L_{\Delta} = \left(\frac{dE}{d\ell} \right)_{\Delta}$$

donde:

dE es la energía perdida al atravesar la distancia $d\ell$, y

Δ es un confín superior de la energía transferida en una colisión cualquiera.

- Medida de cómo se transfiere la energía, en función de la distancia, de la radiación a la materia expuesta a ella. Un valor elevado de transferencia lineal de energía indica que la energía se disipa dentro de una distancia pequeña.
- L_∞ (es decir, con $\Delta = \infty$) recibe el nombre de transferencia lineal de energía sin restricciones, al definir el factor de calidad.
- $L\Delta$ recibe también el nombre de poder de moderación lineal de colisión restringida.

traslocación. Alteración cromosómica en la que un cromosoma entero o un segmento cromosómico se enlazan a otro cromosoma o segmento cromosómico, o se intercambia con él, de tal modo que el híbrido resultante se segrega conjuntamente en la meiosis.

traslocación recíproca (traslocación bidireccional o completa). Intercambio de las porciones terminales de dos cromosomas distintos.

traslocación no recíproca (traslocación unidireccional o incompleta). Traslocación de un solo segmento cromosómico; intercambio no recíproco.

triaje. Priorización de los pacientes en función de la gravedad de su afección. Triage citogenético es el uso de los resultados de la dosimetría biológica para respaldar las decisiones médicas.

tricéntrico. Cromosoma aberrante que tiene tres centrómeros como consecuencia de la unión de partes procedentes de tres cromosomas rotos. A efectos de cálculo se los considera equivalentes a dos dicéntricos y van acompañados de dos fragmentos acéntricos.

varianza. Medida estadística de la distancia a la que se encuentran los valores respecto de un valor central, calculada elevando al cuadrado la desviación estándar.

COLABORADORES EN LA PREPARACIÓN Y REVISIÓN

Ainsbury, E.	Agencia de Protección de la Salud (Reino Unido)
Barquinero, J. F.	Universidad Autónoma de Barcelona (España)
Beinke, C.	Instituto de Radiobiología de las Fuerzas Armadas Federales (Alemania)
Blakely, W. F.	Instituto de Investigación en Radiobiología de las Fuerzas Armadas (Estados Unidos de América)
Braselmann, H.	Centro Helmholtz (Alemania)
Buglova, E.	Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA)
Carr, Z.	Organización Mundial de la Salud (OMS)
Di Giorgio, M.	Autoridad Regulatoria Nuclear (Argentina)
Fenech, M.	Organización de Investigación Científica e Industrial del Commonwealth (Australia)
García Lima, O.	Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones (Cuba)
Kodama, Y.	Fundación para la Investigación de los Efectos de las Radiaciones (Japón)
Lindholm, C.	Organismo de Seguridad Radiológica y Nuclear (STUK) (Finlandia)
Livingston, G.	Universidades Asociadas de Oak Ridge (Estados Unidos de América)
Lloyd, D. C.	Consultor (Reino Unido)
Maznyk, N. A.	Instituto de Radiología Médica de la Academia Nacional de Ciencias de Ucrania (Ucrania)
Prasanna, P. G. S.	Institutos Nacionales de la Salud (Estados Unidos de América)
Previsani, N.	Organización Mundial de la Salud (OMS)
Romm, H.	Oficina Federal de Protección Radiológica (BfS) (Alemania)
Roy, L.	Instituto de Radioprotección y Seguridad Nuclear (IRSN) (Francia)
Voisin, P. J.	Instituto de Radioprotección y Seguridad Nuclear (IRSN) (Francia)
Vral, A.	Universidad de Gante (Bélgica)
Wilkins, R. C.	Salud Canadá (Canadá)
Yoshida, M.	Universidad de Hirosaki (Japón)

RECONOCIMIENTO POR LAS OBSERVACIONES RECIBIDAS

Azizova, T.	Southern Urals Biophysics Institute (Federación de Rusia)
Barrios, L.	Universidad Autónoma de Barcelona (España)
Bognár, G.	Instituto Nacional de Investigación sobre Radiobiología y Radiohigiene (Hungría)
Darroudi, F.	Centro Médico de la Universidad de Leiden (Países Bajos)
Devantier, Y.	Laboratorios de Chalk River (Canadá)
Espinoza Zevallos, M.	Instituto Peruano de Energía Nuclear (Perú)
Guerrero Carbajal, Y. C.	Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (México)
Güçlü, I.	Centro de Investigaciones Nucleares y Capacitación de Çekmece (Turquía)
Hayata, I.	Consultor (Japón)
Martínez-López, W.	Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (Uruguay)
Natarajan, A. T.	Universidad de Tuscia (Italia)
Oliveira, M.	Instituto de Radioprotección y Dosimetría (Brasil)
Palitti, F.	Universidad de Tuscia (Italia)
Pantelias, G.	Instituto de Radioisótopos y Productos para Radiodiagnóstico, Centro Nacional de Investigación Científica “Demokritos” (Grecia)
Sasaki, M. S.	Universidad de Kyoto (Japón)
Sotnik, N.	Southern Urals Biophysics Institute, (Federación de Rusia)
Turai, I.	Instituto Nacional de Investigación sobre Radiobiología y Radiohigiene (Hungría)
Valdivia Pottstock, P.	Comisión Chilena de Energía Nuclear (Chile)
Vozilova, A.	Centro de Investigación de Medicina de las Radiaciones de los Urales (Federación de Rusia)
Wilkinson, D.	Investigación y Desarrollo para la Defensa del Canadá (Canadá)



IAEA

Organismo Internacional de Energía Atómica

Nº 23

PEDIDOS FUERA DEL OIEA

En los siguientes países, las publicaciones de pago del OIEA pueden adquirirse por medio de los proveedores que se indican a continuación, o en las principales librerías locales.

Los pedidos de publicaciones gratuitas deben hacerse directamente al OIEA. Al final de la lista de proveedores se proporcionan los datos de contacto.

ALEMANIA

Goethe Buchhandlung Teubig GmbH

Schweitzer Fachinformationen

Willstätterstrasse 15, 40549 Düsseldorf, ALEMANIA

Teléfono: +49 (0) 211 49 8740 • Fax: +49 (0) 211 49 87428

Correo electrónico: s.dehaan@schweitzer-online.de • Sitio web: <http://www.goethebuch.de>

AUSTRALIA

DA Information Services

648 Whitehorse Road, Mitcham, VIC 3132, AUSTRALIA

Teléfono: +61 3 9210 7777 • Fax: +61 3 9210 7788

Correo electrónico: books@dadirect.com.au • Sitio web: <http://www.dadirect.com.au>

BÉLGICA

Jean de Lannoy

Avenue du Roi 202, 1190 Bruselas, BÉLGICA

Teléfono: +32 2 5384 308 • Fax: +32 2 5380 841

Correo electrónico: jean.de.lannoy@euronet.be • Sitio web: <http://www.jean-de-lannoy.be>

CANADÁ

Renouf Publishing Co. Ltd.

5369 Canotek Road, Ottawa, ON K1J 9J3, CANADÁ

Teléfono: +1 613 745 2665 • Fax: +1 643 745 7660

Correo electrónico: order@renoufbooks.com • Sitio web: <http://www.renoufbooks.com>

Bernan Associates

4501 Forbes Blvd., Suite 200, Lanham, MD 20706-4391, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Teléfono: +1 800 865 3457 • Fax: +1 800 865 3450

Correo electrónico: orders@bernan.com • Sitio web: <http://www.bernan.com>

ESLOVENIA

Cankarjeva Založba dd

Kopitarjeva 2, 1515 Liubliana, ESLOVENIA

Teléfono: +386 1 432 31 44 • Fax: +386 1 230 14 35

Correo electrónico: import.books@cankarjeva-z.si • Sitio web: http://www.mladinska.com/cankarjeva_zalozba

ESPAÑA

Díaz de Santos, S.A.

Librerías Bookshop • Departamento de pedidos

Calle Albasanz 2, esquina Hermanos García Noblejas 21, 28037 Madrid, ESPAÑA

Teléfono: +34 917 43 48 90 • Fax: +34 917 43 4023

Correo electrónico: compras@diazdesantos.es • Sitio web: <http://www.diazdesantos.es>

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Bernan Associates

4501 Forbes Blvd., Suite 200, Lanham, MD 20706-4391, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Teléfono: +1 800 865 3457 • Fax: +1 800 865 3450

Correo electrónico: orders@bernan.com • Sitio web: <http://www.bernan.com>

Renouf Publishing Co. Ltd.

812 Proctor Avenue, Ogdensburg, NY 13669, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Teléfono: +1 888 551 7470 • Fax: +1 888 551 7471

Correo electrónico: orders@renoufbooks.com • Sitio web: <http://www.renoufbooks.com>

FINLANDIA

Akateeminen Kirjakauppa

PO Box 128 (Keskuskatu 1), 00101 Helsinki, FINLANDIA

Teléfono: +358 9 121 41 • Fax: +358 9 121 4450

Correo electrónico: akatilaus@akateeminen.com • Sitio web: <http://www.akateeminen.com>

FRANCIA

Form-Edit

5 rue Janssen, PO Box 25, 75921 París CEDEX, FRANCIA

Teléfono: +33 1 42 01 49 49 • Fax: +33 1 42 01 90 90

Correo electrónico: fabien.boucard@formedit.fr • Sitio web: <http://www.formedit.fr>

Lavoisier SAS

14 rue de Provigny, 94236 Cachan CEDEX, FRANCIA

Teléfono: +33 1 47 40 67 00 • Fax: +33 1 47 40 67 02

Correo electrónico: livres@lavoisier.fr • Sitio web: <http://www.lavoisier.fr>

L'Appel du livre

99 rue de Charonne, 75011 París, FRANCIA

Teléfono: +33 1 43 07 50 80 • Fax: +33 1 43 07 50 80

Correo electrónico: livres@appeldulivre.fr • Sitio web: <http://www.appeldulivre.fr>

HUNGRÍA

Librotade Ltd., Book Import

PF 126, 1656 Budapest, HUNGRÍA

Teléfono: +36 1 257 7777 • Fax: +36 1 257 7472

Correo electrónico: books@librotade.hu • Sitio web: <http://www.librotade.hu>

INDIA

Allied Publishers

1st Floor, Dubash House, 15, J.N. Heredi Marg, Ballard Estate, Bombay 400001, INDIA

Teléfono: +91 22 2261 7926/27 • Fax: +91 22 2261 7928

Correo electrónico: alliedpl@vsnl.com • Sitio web: <http://www.alliedpublishers.com>

Bookwell

3/79 Nirankari, Delhi 110009, INDIA

Teléfono: +91 11 2760 1283/4536

Correo electrónico: bkwel@nde.vsnl.net.in • Sitio web: <http://www.bookwellindia.com/>

ITALIA

Libreria Scientifica "AEIOU"

Via Vincenzo Maria Coronelli 6, 20146 Milán, ITALIA

Teléfono: +39 02 48 95 45 52 • Fax: +39 02 48 95 45 48

Correo electrónico: info@libreriaaeiou.eu • Sitio web: <http://www.libreriaaeiou.eu/>

JAPÓN

Maruzen Co., Ltd.

1-9-18 Kaigan, Minato-ku, Tokyo 105-0022, JAPÓN

Teléfono: +81 3 6367 6047 • Fax: +81 3 6367 6160

Correo electrónico: journal@maruzen.co.jp • Sitio web: <http://maruzen.co.jp>

NACIONES UNIDAS (ONU)

300 East 42nd Street, IN-919J, Nueva York, NY 1001, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Teléfono: +1 212 963 8302 • Fax: +1 212 963 3489

Correo electrónico: publications@un.org • Sitio web: <http://www.unp.un.org>

PAÍSES BAJOS

Martinus Nijhoff International

Koraalrood 50, Postbus 1853, 2700 CZ Zoetermeer, PAÍSES BAJOS

Teléfono: +31 793 684 400 • Fax: +31 793 615 698

Correo electrónico: info@nijhoff.nl • Sitio web: <http://www.nijhoff.nl>

Swets Information Services Ltd.

PO Box 26, 2300 AA Leiden

Dellaertweg 9b, 2316 WZ Leiden, PAÍSES BAJOS

Teléfono: +31 88 4679 387 • Fax: +31 88 4679 388

Correo electrónico: tbeysens@nl.swets.com • Sitio web: <http://www.swets.com>

REINO UNIDO

The Stationery Office Ltd. (TSO)

PO Box 29, Norwich, Norfolk, NR3 1PD, REINO UNIDO

Teléfono: +44 870 600 5552

Correo electrónico: (pedidos) books.orders@tso.co.uk • (consultas) book.enquiries@tso.co.uk •

Sitio web: <http://www.tso.co.uk>

REPÚBLICA CHECA

Suweco CZ, spol. S.r.o.

Klecakova 347, 180 21 Praga 9, REPÚBLICA CHECA

Teléfono: +420 242 459 202 • Fax: +420 242 459 203

Correo electrónico: nakup@suweco.cz • Sitio web: <http://www.suweco.cz>

Los pedidos de publicaciones, tanto de pago como gratuitas, se pueden enviar directamente a:

Sección Editorial del OIEA, Dependencia de Mercadotecnia y Venta,

Organismo Internacional de Energía Atómica

Vienna International Centre, PO Box 100, 1400 Viena, Austria

Teléfono: +43 1 2600 22529 ó 22488 • Fax: +43 1 2600 29302

Correo electrónico: sales.publications@iaea.org • Sitio web: <http://www.iaea.org/books>

