

LA TÉCNICA DE DICÉNTRICOS PARA DOSIMETRÍA BIOLÓGICA

Inmaculada Domínguez García¹, Nuria María Pastor Carrillo¹, Florencio Javier Luis Simón.²

¹Departamento de Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla; ²Servicio de Radiofísica. Hospital Universitario Virgen del Rocío

idomin@us.es; npastor@us.es; fjavier.luis.sspa@juntadeandalucia.es

RESUMEN

La dosimetría biológica es la estimación de la dosis recibida por un individuo a partir del análisis de un parámetro biológico que varía cuantitativamente con la dosis^{1,2}. Permite estimar la dosis de exposición a radiación ionizante en casos de accidentes radiológicos, y en personal ocupacionalmente expuesto, además de en algunos tipos de irradiación a pacientes.

La radiación ionizante produce lesiones en el ADN que a su vez pueden formar aberraciones cromosómicas. Existe una correlación cuantitativa muy fiable entre la dosis de exposición a radiación ionizante de las células y el nivel de aberraciones cromosómicas de tipo dicéntrico. La frecuencia de dicéntricos se mantiene relativamente estable después de 4 semanas de la irradiación. Por ello los dicéntricos son el biomarcador más sensible y ampliamente utilizado en dosimetría biológica, constituyendo el ensayo estándar de la Organización Mundial de la Salud y de la Agencia Internacional de Energía Atómica para estimar la exposición a radiación en la población.

El ensayo consiste básicamente en analizar el número de dicéntricos en linfocitos humanos de sangre periférica, y realizar una estimación de la dosis a partir de curvas dosis-respuesta que se han obtenido previamente mediante exposición *in vitro* a dosis conocidas de radiación.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Radiación ionizante

La radiación es la emisión de energía que se propaga en cualquier medio en forma de ondas o partículas; se denomina radiación ionizante (RI) cuando tiene suficiente energía para provocar la ionización de los átomos y moléculas del medio que atraviesa. Las RI se pueden transmitir en forma de ondas electromagnéticas, como los rayos X o los rayos γ , o en forma corpuscular, como las partículas con masa, ya sean con carga (partículas α o β) o sin carga (neutrones).

La RI se puede cuantificar como dosis absorbida (D) definida como cantidad de energía de radiación depositada por unidad de masa de material irradiado, cuya unidad en el sistema internacional es el Gray (Gy).

Los distintos tipos de RI depositan la energía de forma distinta a lo largo de su trayectoria (Figura 1). La transferencia lineal de energía (LET) es la energía media depositada a lo largo del recorrido de una partícula por unidad de longitud. Las radiaciones de baja LET generan

pocos sucesos ionizantes por unidad de longitud, como los rayos X o los rayos γ . Las de alta LET producen muchas ionizaciones por unidad de longitud, como las partículas α , β y los neutrones.

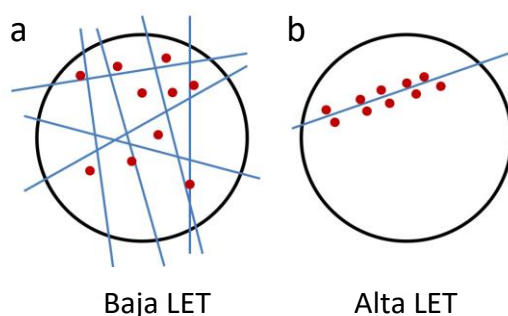


Figura 1. Distribución de la energía en la radiación ionizante a. Radiaciones de baja LET. b. Radiaciones de alta LET. Adaptada de Radiation Effects Research Foundation³

1.2 Efectos de las radiaciones ionizantes sobre el ADN

Las RI pueden producir daño en el DNA de manera directa o indirecta (Figura 2). La interacción directa con el ADN produce su ionización e inicia una cadena de eventos que darán lugar a un cambio en su estructura. La acción directa es el proceso dominante en las radiaciones de alta LET, como neutrones o partículas α .

En la interacción indirecta, las RI interactúan con otros átomos y moléculas de la célula, principalmente agua, provocando su excitación o ionización. La radiólisis del agua forma moléculas (H_2 , H_2O_2), iones (H_2O^+ , H_2O^- , H_3O^+), o radicales libres ($H^\cdot$, $^{\cdot}OH$, $H_2O^\cdot$). Algunos de estos productos son altamente reactivos y pueden interactuar con el DNA produciendo cambios en su estructura. Se estima que dos terceras partes del daño producido por los rayos X en el DNA de células de mamífero está causado por la acción indirecta.

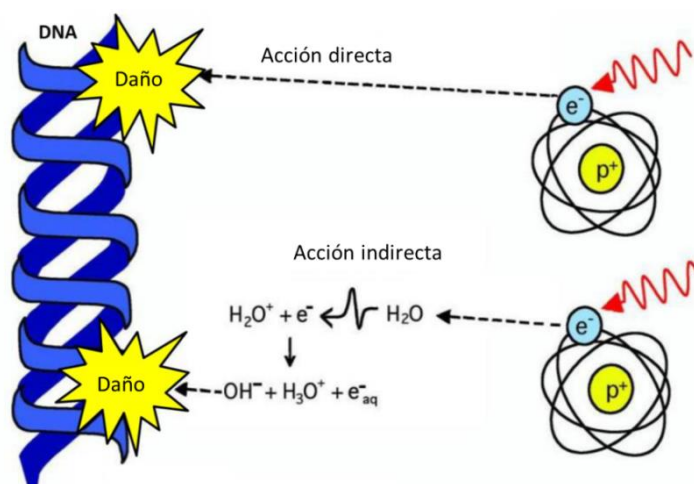


Figura 2. Acción directa e indirecta de las RI sobre el DNA. Adaptada de Hall & Giaccia⁴

Las RI producen distintos tipos de lesiones en el DNA, como daños en las bases (Base Damage, BD), roturas de cadena simple (Single Strand Break, SSB), sitios abásicos (Abasic Site, AS), uniones DNA-proteína (DNA-protein cross-link, DPC), y roturas de doble

cadena (Double Strand Break, DSB). Cuando distintas lesiones simples coinciden en un segmento corto de DNA se consideran lesiones complejas o clúster de daño⁵.

Las DSBs son las lesiones primarias críticas en la formación de alteraciones cromosómicas y son potencialmente letales⁶. La producción de daño en el ADN activa los sistemas de reparación celular. Dos de los principales mecanismos de reparación de DSBs son el sistema de reparación por recombinación homóloga (Homologous Recombination Repair, HRR) y la reparación de extremos no homólogos (Non Homologous End Joining, NHEJ). NHEJ actúa en todas las fases del ciclo celular, con mucha actividad en G1, y reúne extremos rotos de forma arbitraria siendo propensa a error, mientras HRR funciona al final de las fases S y G2, y utiliza secuencias no dañadas del genoma como patrón para realizar una reparación correcta, restaurando la secuencia original del cromosoma. Cuando se producen lesiones primarias en el ADN que se reparan de forma incorrecta o no se reparan, dan lugar a reorganizaciones cromosómicas o roturas detectables en células en metafase que son las aberraciones cromosómicas (AC). El tipo de lesión implicada en la formación de AC es la rotura de doble cadena de ADN.

Las AC pueden ser cromatídicas si afectan a una sola cromátida y cromosómicas si afectan a ambas⁷. Entre las aberraciones de tipo cromatídico están las deleciones terminales de una sola cromátida, deleciones isocromatídicas o intercambios cromatídicos, que se pueden formar por intercambios simétricos o asimétricos.

Las AC más relevantes en dosimetría biológica (DB) son de tipo cromosómico (Figura 3) y entre ellas están anillos, dicéntricos y translocaciones. Las AC pueden ser inestables si presentan problemas de segregación durante la mitosis e incluyen los cromosomas dicéntricos, los cromosomas en anillo y los fragmentos acéntricos, siendo identificables fácilmente mediante tinciones homogéneas.

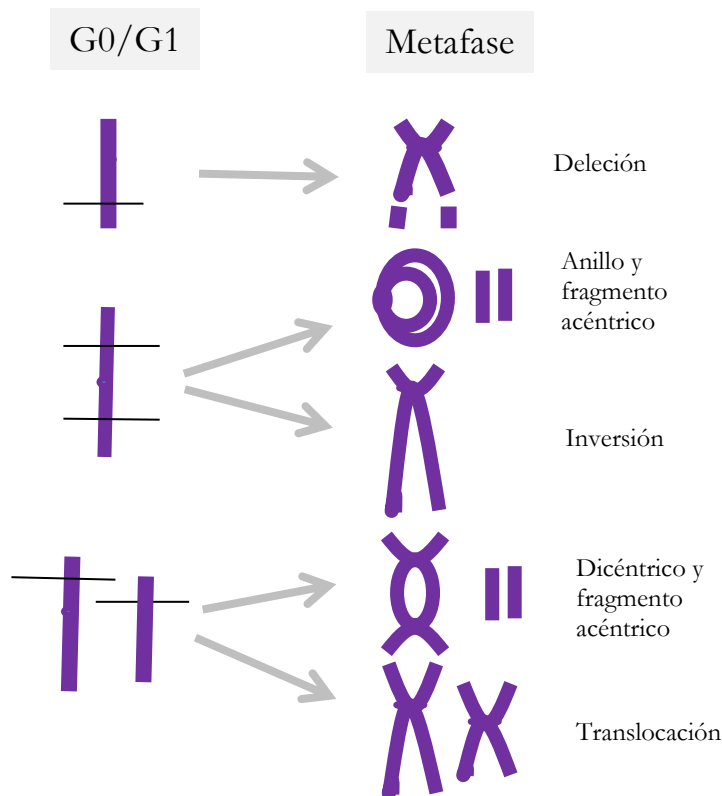


Figura 3. Producción de aberraciones de tipo cromosómico

En el ensayo de dicéntricos en DB se pueden analizar dicéntricos o bien dicéntricos y anillos.

Los dicéntricos (DC) se forman por intercambio asimétrico entre dos cromosomas rotos que conservan el centrómero, y en su forma completa está acompañado por un fragmento acéntrico (FA) compuesto por las piezas acéntricas de estos cromosomas. A altas dosis de radiación se pueden formar configuraciones multicéntricas. Los tricéntricos están acompañados de dos fragmentos acéntricos, los cuadricéntricos de 3, etc. El anillo (AN) es un intercambio de dos roturas de diferentes brazos de un mismo cromosoma, formándose como consecuencia un fragmento acéntrico. En linfocitos humanos los anillos céntricos son mucho menos frecuentes que los dicéntricos.

Los fragmentos acéntricos se pueden formar independientemente de los intercambios descritos y se denominan exceso de acéntricos. Con baja frecuencia pueden aparecer células Rogue, metafases con un nivel de daño cromosómico extremadamente elevado sin una causa clara. En biodosimetría se recomienda excluir estas células de la evaluación, con la excepción de posibles exposiciones a radiación de alta LET. Otras técnicas de DB utilizan las translocaciones, aberraciones estables de tipo cromosómico que se detectan mediante hibridación *in situ* con fluorescencia.

1.3 Dosimetría biológica

La RI es un clastógeno S-independiente capaz de producir DSBs. Por ello la exposición a RI de células en G0/G1 y G2/S puede inducir respectivamente aberraciones tipo cromosómico y tipo cromatídico. En DB se usan principalmente dicéntricos porque son fáciles de observar al microscopio y su frecuencia basal es muy baja (1-2/1000 células) en individuos no expuestos. Además, en casos de irradiación, la frecuencia de DC es relativamente estable hasta 4 semanas después de la misma. Otros aspectos que lo hacen ser el biomarcador estándar en biodosimetría son su alta sensibilidad (una dosis umbral de 0,05 Gy) y su dependencia de la dosis hasta 5 Gy (para fotones).

La exposición de los linfocitos de sangre periférica a RI, produce niveles de dicéntricos similares por unidad de dosis *in vitro* e *in vivo*, de manera que la estimación de la dosis de una persona expuesta se puede hacer comparando las frecuencias de dicéntricos observada con la curva dosis- respuesta obtenida *in vitro*.

El análisis de dicéntricos en linfocitos se ha usado en multitud de casos en los que había sospecha de sobreexposición a radiación, quedando acreditada su fiabilidad. Existen, sin embargo, otras técnicas en biodosimetría como el test de micronúcleos y la detección de translocaciones, o técnicas moleculares basadas en cambios en la expresión de algunos genes.

En casos de sospecha de sobreexposición, la DB ayuda a definir el estado del paciente como complemento de la dosimetría física y el reconocimiento médico. La DB es particularmente importante porque tiene en cuenta la variabilidad entre individuos, a diferencia de la dosimetría física. Es un método preciso, ya que existe una relación matemática que permite calcular la dosis, establecer el grado de homogeneidad de la exposición y, en casos de exposiciones no homogéneas, establecer la fracción del cuerpo irradiada y la dosis que recibió esa fracción.

En casos de exposiciones altas (>1 Gy aguda), el conocimiento de la dosis estimada ayuda a planificar la terapia y a prever posibles consecuencias en la salud (efectos determinísticos,

daño en tejidos) en las semanas y meses posteriores a la radiación. Cuando la dosis estimada está por debajo del nivel que requiere tratamiento, hay que tener en cuenta posibles efectos estocásticos (como el riesgo de cáncer). Si la exposición es muy baja (< 50 mGy), la información es útil para tranquilidad de la persona expuesta.

1.4 Linfocitos

Los linfocitos son las células que se utilizan para biodosimetría. Los linfocitos humanos de sangre periférica se encuentran en su mayoría en la fase G_0 del ciclo celular, sólo un 0,2% o menos están en ciclo. Pueden ser estimulados *in vitro* a entrar en ciclo mediante tratamiento con fitohemaglutinina (PHA) derivada de la planta *Phaseolus vulgaris*⁸. Los linfocitos pequeños son la diana de la PHA⁹. La PHA induce su transformación aumentando su volumen que tras 48 horas de estimulación pasa de $\sim 110 \mu m^3$ a unos $500 \mu m^3$. Existen dos tipos principales de linfocitos, B y T, y distintas subpoblaciones de ambos que tienen características inmunológicas específicas, marcadores de superficie y vida media diferente. Son los linfocitos T, CD4+ y CD8+, los que principalmente se estimulan *in vitro* por PHA y se usan en biodosimetría.

La concentración de linfocitos en sangre periférica varía en función de la edad, raza, presencia de patógenos y factores ambientales como humo de tabaco. La irradiación a alta dosis de cuerpo entero disminuye la cantidad de linfocitos rápidamente.

Los linfocitos de sangre periférica abandonan la sangre, pasan por el bazo, nódulos linfáticos y otros tejidos y retornan a la circulación. Se ha estimado que el 80% de los linfocitos está en el pool de redistribución. El tiempo total de recirculación es de 12 horas y el tiempo medio que un linfocito está en sangre periférica es de 30 min.

Esto significa que los linfocitos con AC inducidas en cualquier parte del cuerpo, en algún momento pasan a estar presentes en sangre periférica por lo que el ensayo detecta, además de las AC producidas en sangre periférica, las inducidas en otros órganos¹⁰.

La progresión en el ciclo celular tras estimulación con PHA puede variar con diferentes condiciones de cultivo.

2. EL ENSAYO DE DICÉNTRICOS

El análisis de cromosomas dicéntricos es la técnica de referencia para estimar la dosis en casos de sobreexposición a RI². El ensayo estandarizado está detallado y publicado en la guía *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies*², y se sigue aplicando actualmente sin haber variado sustancialmente. Los laboratorios de referencia para la realización del ensayo de dicéntricos están acreditados por la norma UNE ISO 17025 (International Standard Organization 17025) con alcance técnico a la UNE ISO 19238 que, además de especificar los requerimientos técnicos, proporciona los estándares de calidad y evaluación del procedimiento. En España el laboratorio acreditado por esta norma es el de Dosimetría Biológica del Servicio de Oncología Radioterápica en el Hospital Gregorio Marañón.

La figura 4 muestra el esquema estándar para la realización de un cultivo de linfocitos con el objetivo de estimar la dosis de exposición a RI. Una vez recibida la sangre, ésta se mezcla con el medio de cultivo y PHA para que los linfocitos progresen en el ciclo celular. A las 48 horas de cultivo se añade colcemida durante 2,5 horas para detener los linfocitos en metafase. A continuación se procesan las células incluyendo tratamiento con hipotónico y fijador, y se obtienen preparaciones con metafases. Las preparaciones se tiñen y se ponen en definitivo, y se realiza el análisis de dicéntricos o dicéntricos y anillos en metafases de

células de primera mitosis. Finalmente se estima la dosis de exposición mediante la utilización de una curva dosis- respuesta previamente obtenida.

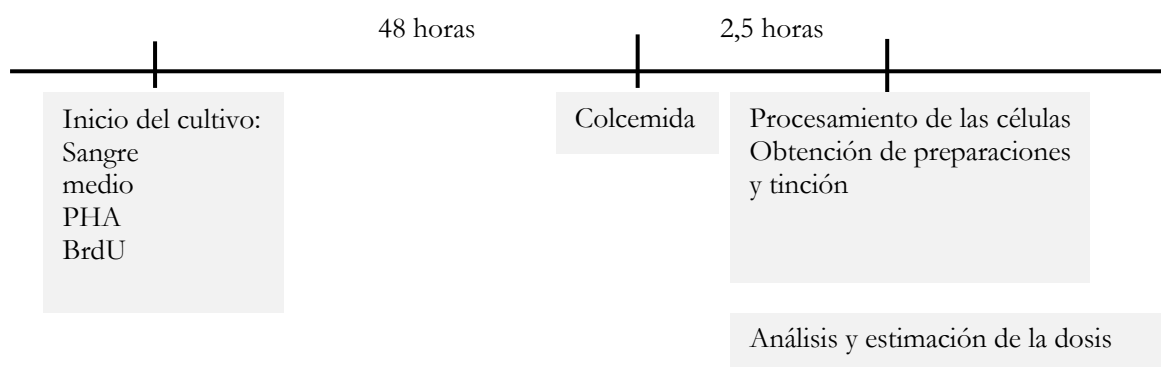


Figura 4. Procedimiento estándar para la estimación de dosis mediante el ensayo de dicéntricos

2.1.- Extracción de la muestra de sangre y transporte

La sangre debe extraerse en tubos estériles desechables de cristal o plástico con heparina litio como anticoagulante.

La extracción se debe hacer en general lo antes posible tras la irradiación de cuerpo entero. Si la exposición no es muy alta, aunque los parámetros hematológicos se pueden mantener entre los límites normales hasta 4 semanas después de haberse producido la irradiación, la producción de AC empieza a decaer pronto, lo que aumentaría la incertidumbre en la estimación. Si la exposición es alta, el tiempo que tardan los linfocitos en disminuir a niveles insuficientes para el análisis citogenético es menor, de entre unas horas y pocos días. En casos de exposiciones parciales o no uniformes, los linfocitos circulantes y del pool extravascular no habrán llegado al equilibrio hasta las 24 horas. Para evitar una proporción no representativa de células irradiadas, se recomienda hacer la extracción al día siguiente de la exposición en estos casos.

Hay situaciones en las que no se pueden establecer los cultivos inmediatamente tras la extracción de la sangre, con lo que la viabilidad de los linfocitos puede disminuir por debajo de lo necesario para hacer el ensayo. Para evitarlo es conveniente añadir PHA inmediatamente después de la extracción y mantenerlos a temperatura menor de 20°C, de manera que los linfocitos no progresan a través del ciclo celular hasta que se calientan a 37°C.

La sangre se debe mantener entre 18 y 24°C durante el transporte, en ningún caso se debe congelar. Si se prevé que las temperaturas van a estar fuera de este rango, se aconseja utilizar un embalaje termoaislante y medidores de temperatura. El transporte de las muestras debe cumplir la regulación nacional y/o internacional para sustancias infecciosas, como indica la Organización Mundial de la Salud (WHO, World Health Organization)¹¹. Los tubos deben introducirse en un segundo contenedor que impida escapes de líquidos. El contenedor externo debe marcarse como UN3373. BIOLOGICAL SUBSTANCE, CATEGORY. Durante el transporte la sangre no debe ser expuesta a los rayos X de los controles de seguridad, por lo que el paquete irá con la marca DO NOT X-RAY.

2.2 Establecimiento de los cultivos

Una vez recibida la sangre se deben hacer varias réplicas de cultivos por cada muestra. Los cultivos se pueden hacer de sangre completa o de linfocitos aislados^{12, 13}.

a) Cultivos de sangre completa

Aunque las proporciones pueden variar entre laboratorios, la propuesta en la guía de la IAEA² es realizar una mezcla de 0,3 ml de sangre completa, 4 ml de medio de cultivo, 1 ml de suero y PHA al 2%. Se puede añadir también bromodesoxiuridina (BrdU).

Se utilizan recipientes estériles de cristal autoclavables o de plástico desechables.

Este método es más rápido que otros, emplea entre 1-2 ml de sangre, pero se obtienen menos metafases.

b) Cultivos de linfocitos aislados

Hay dos métodos para enriquecer la suspensión de linfocitos en el cultivo:

b.1) Se mezclan 2 ml de sangre con 0,15 ml de PHA, 2 ml de suero, y se centrifuga 1 minuto a 50g. Se recoge el sobrenadante de 3 ml que contiene suero, plasma y buffy coat (con células blancas) dejando atrás la mayoría de células rojas aglutinadas. Los 3 ml de fluido son suficientes para hacer dos cultivos, que se reparten en dos recipientes cada uno con 4 ml de medio.

b.2) Los linfocitos se aíslan de sangre completa mediante centrifugación en ficoll-hipaque, obteniéndose una fracción rica en linfocitos entre esta sustancia y el plasma. Es aconsejable determinar la concentración de células viables para sembrar 0,5 - 2 millones de linfocitos/ml. Este método suele producir preparaciones más limpias con muchas metafases.

Una vez iniciados los cultivos se mantienen en el incubador de CO₂ a 37°C durante 48 h. Se pueden cultivar en incubadores sin CO₂ con los tapones cerrados. El mantenimiento de la temperatura a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ es muy importante, y se deben hacer registros periódicos de la misma. Las temperaturas bajas resultan en poca obtención de metafases a las 48 horas. Si la temperatura es alta, las células progresan más rápidamente y se obtendrán niveles demasiado altos de metafases en segunda división.

2.2.1 Materiales

El medio de cultivo suele ser RPMI-1640 suplementado con L-glutamina y antibióticos (penicilina y estreptomycin), aunque se pueden usar otros medios como F-10 o MEM. En RPMI -1640 y F-10 los cultivos crecen más rápido. No se deben usar medios sin ácido fólico.

En cuanto al suero, se puede usar suero fetal bovino. El suero debe descomplementarse a $56^\circ\text{C} \pm 1$ durante 30 min a 1 h, lo que ayuda a reducir la variabilidad entre lotes. Debe añadirse al medio en una proporción de 10 a 20%.

Los mitógenos suelen ser moléculas tipo lectinas. El más usado es la fitohemaglutinina. Hay dos tipos comercializados, tipo M y P. La PHA-P está altamente purificada, y no es necesaria para los cultivos rutinarios con sangre completa. Se suele utilizar en linfocitos

aislados. La PHA debe estar al 2% en el cultivo. Hay otros mitógenos disponibles como concanavalina A.

En el cultivo debe incluirse bromodesoxiuridina para diferenciar las células de primera y segunda mitosis (M1 y M2). El análisis de DC debe hacerse en M1, para evitar que se pierdan células que son portadoras de dicéntricos. La BrdU es un análogo de timidina que se incorpora en el ADN. Las células que hacen dos replicaciones del ADN en presencia de BrdU, al llegar a mitosis tienen diferente nivel de incorporación de BrdU en sus cromátidas, y mediante la técnica Fluorescence Plus Giemsa (FPG) se tiñen diferencialmente ¹⁴. Así en las células M1 las cromátidas aparecen teñidas de forma homogénea, y en las M2 de forma diferencial.

La concentración en el cultivo de BrdU no debe ser mayor de 50 μ M (15,4 μ g/ml). Por encima de esta concentración, la BrdU puede producir retraso de la progresión del ciclo celular. El tiempo de cultivo con BrdU y fijación de la muestra debe permitir que la mayoría de las células estén en primera mitosis. El ciclo celular puede presentar variaciones en su progresión en distintos individuos. Además, la radiación puede retrasar el ciclo celular, por lo que las células más dañadas presentarán mayor retraso. En la práctica los laboratorios usan un único tiempo de cultivo y fijación. Se podrían hacer varios cultivos con diferentes tiempos de incubación para seleccionar los que tengan mayor proporción de células en primera mitosis. Sin embargo esto requiere mucho más tiempo y con los pacientes no es posible en muchas ocasiones en las que se requiere rapidez en la evaluación.

Hayata y col.¹⁵ utilizaron citoclasina B para inhibir la citocinesis, añadiéndola a las 24 horas de cultivo. De esta forma se pueden identificar las células que están en primera mitosis por el número de cromosomas. Esta modificación en la técnica de dicéntricos se ha usado en algunas comparaciones entre laboratorios con éxito, pero no es de uso generalizado.

2.3 Arresto mitótico

Los cultivos de linfocitos se incuban 48 horas, aunque el tiempo puede variar entre 46 y 52 horas. Los laboratorios establecen el tiempo óptimo con el que se obtenga una buena producción de metafases M1 en el procedimiento de rutina.

Para detener las células en metafase se añade colchicina o su análogo sintético demecolcina (colcemida), durante las 2-3 últimas horas de cultivo. Estos compuestos actúan inhibiendo la polimerización de dímeros de tubulina, lo que impide la formación del huso mitótico y por tanto la separación de cromátidas. La colcemida se debe añadir a una concentración de 0,05-1 μ g/ml en el cultivo, que proporciona suficientes metafases y no es tóxica.

Hay algunos investigadores que añaden la colcemida después de 24 horas de cultivo; en algunos casos incluso al inicio del cultivo para evitar las células de segundas mitosis. Este método sin embargo, produce contracción excesiva de los cromosomas a menos que se baje la concentración a 0,05 μ g/ml. En estos casos se pueden prolongar los cultivos más de 48 horas, lo cual puede ser útil en algunos individuos de avanzada edad por ejemplo.

2.4 Tratamiento hipotónico y fijación. Obtención de preparaciones

Una vez transcurrido el tiempo total de cultivo y finalizado el tratamiento con colcemida, las células son procesadas para la obtención de preparaciones.

El procedimiento no requiere esterilidad y se puede realizar a temperatura ambiente. La manipulación de las muestras debe hacerse de forma segura, puesto que pueden contener patógenos.

Los cultivos se centrifugan, se elimina el sobrenadante y se añade la solución de hipotónico, compuesta por cloruro de potasio 0,075M (5 ml), unos 15 min a 37°C para conseguir que los cromosomas se separen de forma adecuada. Si se trata de linfocitos aislados es suficiente con dejar el hipotónico 3-5 minutos. También se puede añadir 1 ml de fijador al hipotónico durante 5 a 10 minutos para minimizar la lisis tras la centrifugación.

Después del tratamiento hipotónico, se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 5-10 ml de fijador recién preparado (compuesto por 3 partes de metanol y 1 de ácido acético). El fijador se debe añadir lentamente mientras se mueve el tubo para mezclar. Esto es importante para que las células queden dispersas en la suspensión. Las células se centrifugan de nuevo; se hacen en total 3 fijaciones. Las preparaciones se pueden hacer inmediatamente. También es posible mantener los linfocitos en fijador unos días a 4°C, y más tiempo a -20°C si es necesario.

Tras la última fijación, se deja la cantidad de fijador necesaria para que la concentración de células sea óptima en la preparación. Para mejorar la calidad de las preparaciones, los portaobjetos se pueden desengrasar y sumergir en agua fría previamente. Es aconsejable comprobar si la concentración de células es óptima y están suficientemente limpias de restos celulares. Lo ideal es hacer más de una preparación por cultivo. Una vez hechas las preparaciones se dejan secar.

2.5 Tinción

Hay dos opciones:

- a) Tinción con FPG y análisis de las aberraciones exclusivamente en las metafases de primera mitosis. La calidad de las preparaciones se ve afectada negativamente por esta tinción, y no suele ser buena para el análisis.
- b) Tinción FPG de 1 o 2 portas de cada cultivo para determinar el porcentaje de M1. Si éste es menor del 5%, se puede teñir el resto de preparaciones con Giemsa homogéneamente y analizar en ellas las aberraciones cromosómicas.

Lo ideal es tener un protocolo que produzca pocas M2, aunque no se puede predecir el comportamiento de los linfocitos de diferentes individuos en cuanto a estimulación y proliferación. La adaptación de la técnica con citocalasina B junto a la colcemida, o con colcemida durante mucho tiempo en el cultivo, son alternativas a la FPG. Estas adaptaciones pueden ser útiles en escenarios de triaje donde se requiere la estimación rápida de la dosis.

2.5.1 Tinción FPG

Las preparaciones se tratan con Hoesch 33258 y se iluminan con luz UV durante 30 minutos¹⁴, con lo que en las cromátidas con mayor nivel de bromosustitución la estructura se desorganiza más. A continuación se lavan y se tiñen con Giemsa, que teñirá de forma menos intensa las cromátidas más fotodegradadas (Figura 5).



Figura 5. Metafase de segunda mitosis teñida con FPG¹⁶

2.5.2 Tinción convencional con Giemsa

Las preparaciones se tiñen con Giemsa al 3-5% diluido en tampón fosfato de pH 6,8 durante 5 minutos; se enjuagan con agua y se dejan secar. Se coloca entonces un cubreobjetos con medio de montaje.

2.6 Análisis de las preparaciones

Las preparaciones se deben codificar para evitar sesgos en el análisis. En el análisis con microscopía convencional y manual se debe observar la preparación completa con pocos aumentos y analizar las metafases encontradas de buena calidad con mayor aumento (x1000 o x2000). En caso de preparaciones teñidas con FPG, sólo se analizarán las teñidas homogéneamente, que son las M1.

Las metafases que se analizan deben cumplir los siguientes criterios¹⁷ (Figura 6):

- 46 centrómeros visibles.
- Cromosomas con morfología buena: contorno nítido, no demasiado condensados ni demasiado largos.
- Cromosomas bien separados.
- Poco citoplasma residual.

En el análisis de las aberraciones hay que tener en cuenta lo siguiente:

- Si la metafase contiene 1 dicéntrico, puede aparecer el fragmento acéntrico correspondiente. En este caso sigue habiendo 46 centrómeros y 46 piezas (Figura 6a).
- Si la metafase presenta 1 anillo, habrá 46 centrómeros y 47 piezas, por el fragmento acéntrico acompañante.
- Se registrarán también los fragmentos acéntricos no asociados a dicéntricos o anillos como exceso de acéntricos. Por tanto los fragmentos asociados a dicéntricos o anillos no se incluirán como exceso de fragmentos acéntricos.
- Pueden aparecer varias aberraciones en la misma metafase, sobre todo en dosis altas.
- Los tricéntricos son equivalentes a dos dicéntricos con dos fragmentos acéntricos.
- Se deben registrar todas las alteraciones aunque para biodosimetría sólo se tendrán en cuenta los dicéntricos o dicéntricos y anillos.
- Se deben anotar las coordenadas de cada metafase analizada tengan o no aberraciones, por si fuese necesario su comprobación en algún momento posterior.



Figura 6 a. Metafase adecuada para el análisis donde las flechas indican la presencia de varios dicéntricos. b. metafase que no cumple los criterios para el análisis¹⁷

Algunos laboratorios utilizan sistemas automáticos para realizar la evaluación de las preparaciones. Estos softwares normalmente sirven para localizar metafases candidatas a ser analizadas en las preparaciones¹⁸, aunque también se están desarrollando programas de reconocimiento de dicéntricos basados en inteligencia artificial¹⁹.

El número de células que debe analizarse recomendado por la IAEA² es aquel en el que se registren 100 dicéntricos como mínimo. La práctica común en biodosimetría es examinar entre 250 y 500 metafases. Si el número de personas expuestas es muy elevado, se aplica el triaje para tener resultados más rápidamente, y se analizan 50 células (o 30 dicéntricos). Las estimaciones mediante triaje son suficientemente fiables para aportar información útil desde el punto de vista médico.

Las hojas de registro de datos deben estar bien diseñadas para recoger toda la información relevante del análisis. Es importante guardar los archivos de análisis de sobreexposiciones, ya que podría ser necesario examinarlos de nuevo pasado un tiempo. Esto podría ocurrir en personas que desarrollen cáncer, mucho tiempo después de la exposición.

Las preparaciones deben guardarse en cajas cerradas y ambiente seco. Tienden a perder la tinción cuando pasan algunos meses; en estos casos se puede intentar quitar el cubre y volver a teñir. Son buenas prácticas guardar sin teñir alguna réplica a -20°C y guardar células fijadas a alta densidad a -20°C , lo que permitiría hacer nuevas preparaciones al cabo del tiempo si fuera necesario.

3. ESTIMACIÓN DE LA DOSIS

3.1 Curvas de calibración

En los casos de exposición las fuentes de radiación suelen ser de rayos γ , X y ocasionalmente neutrones. Hay diferencias en las curvas dosis-respuesta de rayos X y γ , sobre todo a dosis bajas ($< 0,5$ Gy), por lo que es mejor disponer de ambos tipos de curvas. Las curvas dosis-respuesta para neutrones son lineales y no cambian mucho con la energía de los neutrones, por lo que es suficiente tener una curva.

Para producir curvas dosis-respuesta los linfocitos deben irradiarse *in vitro* de la forma más parecida a como tendrá lugar *in vivo*²⁰. Para ello se utilizan muestras de sangre completa que

se irradian a 37°C. Las dosis que se administran a las muestras *in vitro* deben ser precisas, respaldadas por una dosimetría física con una cámara de ionización, calibrada con un patrón primario o secundario. Las muestras de sangre se colocarán de manera que la dosis pueda calcularse fácilmente y posicionada de modo que la irradiación se pueda considerar uniformemente distribuida en la muestra.

Tras la irradiación, se mantienen 2 horas a 37°C y a continuación se cultivan con el protocolo estándar para dicéntricos. Es aconsejable usar 10 o más dosis en el rango 0,25-5 Gy. Para la RI de baja LET (Figura 7) no se requieren dosis superiores a 5 Gy, ya que pueden aparecer signos de saturación de aberraciones. Para radiación de alta LET es suficiente con una dosis máxima de 2 Gy.

Dosis (Gy)	N	X	Distribución de dicéntricos en las células							σ^2/y	u
			0	1	2	3	4	5	6		
0.000	5000	8	4992	8						1.00	-0.07
0.100	5002	14	4988	14						1.00	-0.13
0.250	2008	22	1987	20	1					1.08	2.61
0.500	2002	55	1947	55						0.97	-0.86
0.750	1832	100	1736	92	4					1.03	0.79
1.000	1168	109	1064	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
Media										1.0	

Figura 7. Datos de dicéntricos obtenidos en muestras de sangre irradiadas para una curva de calibración de rayos γ^2 .

Se recomienda analizar 5000 células para determinar el nivel basal de dicéntricos, entre 3000 y 5000 células en dosis menores de 1 Gy; para las dosis superiores a 1 Gy se deben analizar 100 dicéntricos.

3.2 Formación de dicéntricos con RI de alta y baja LET. Ecuaciones de ajuste.

Como ya se ha dicho, para que se produzca un dicéntrico se debe inducir daño en dos cromosomas no replicados entre los que se produce un intercambio como consecuencia de la reparación incorrecta de las roturas de doble cadena. Las lesiones en los dos cromosomas deben estar cerca, dentro de la llamada distancia de reunión para que la reparación incorrecta tenga lugar. Esta zona de interacción o target es pequeña, menor de 1.0 μm de diámetro.

En radiaciones de baja LET la frecuencia de ionización por unidad de longitud es baja y la probabilidad de que una trayectoria de radiación produzca dos ionizaciones en el mismo target también es baja. Las dos ionizaciones requeridas para producir un dicéntrico se producen con mayor probabilidad por trayectorias de radiación independientes. La frecuencia de dicéntricos producidos por dos trayectorias varía con el cuadrado de la dosis. A dosis menores de 0,5 Gy la probabilidad de que dos ionizaciones de trayectorias independientes atravesen el mismo target es tan baja que los dicéntricos se producen casi exclusivamente por 1 evento, y tendrán una frecuencia proporcional a la función lineal de la dosis. Por ello la curva dosis-respuesta para DC inducidos por radiación de baja LET es una combinación de eventos producidos por 1 o 2 trayectorias, siendo el primero más

frecuente a dosis bajas y el segundo más frecuente a dosis altas. Las curvas dosis-respuesta se definen por la ecuación:

$$1. \quad Y = C + \alpha D + \beta D^2$$

donde:

Y es la producción de dicéntricos

D es la dosis

C es el control o frecuencia basal

α es el coeficiente lineal y

β es el coeficiente cuadrático

Los dicéntricos formados por una trayectoria están representados por el componente lineal αD de la función, y los dicéntricos formados por dos trayectorias están representados por el componente cuadrático βD^2 .

En RI de alta LET la posibilidad de que dos lesiones en un target sean inducidas por dos ionizaciones de la misma trayectoria de radiación es mayor. Por ello la relación entre la dosis y la frecuencia de dicéntricos se convierte en la función lineal²¹:

$$2. \quad Y = C + \alpha D$$

En resumen, las curvas dosis-respuesta para RI de baja LET como rayos X y rayos γ se ajustan a un modelo lineal-cuadrático; para RI de alta LET se ajustan a un modelo lineal (Figura 8).

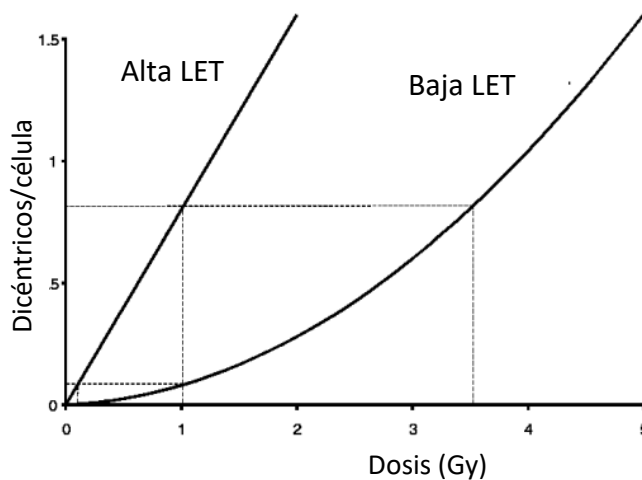


Figura 8. Curvas dosis-respuesta lineal (alta LET) y lineal-cuadrática (baja LET). Adaptada de IAEA, 2011².

Debido a la LET, una misma D de distintos tipos de RI puede producir un efecto biológico diferente. Se llama eficacia biológica relativa (RBE) al cociente entre la dosis de referencia, normalmente los rayos X de 250 KeV, y la dosis de una radiación particular que produce el mismo efecto biológico. Así, para 3,5 Gy de RI de baja LET, el número de dicéntricos producido es el equivalente al producido por 1 Gy de RI de alta LET, por lo que la RBE sería: $3.5/1.0 = 3.5$. Para baja producción de dicéntricos la RBE es mayor: $1.0/0.1 = 10$ (Figura 8).

Las lesiones inducidas en el ADN que pueden convertirse en dicéntricas pueden ser reparadas. El tiempo de reparación puede ser de pocos minutos a varias horas dependiendo del tipo particular de lesión. Al disminuir la tasa de dosis, aumenta la probabilidad de reparación de la primera lesión producida antes de inducirse la segunda, y esto afecta más a la RI de baja LET, donde las dos lesiones se producen más frecuentemente por sucesos independientes. Para radiación de baja LET, disminuir la tasa de dosis disminuye la frecuencia de dicéntricas por unidad de dosis, de modo que a tasas de dosis muy bajas la curva es lineal y es igual que la componente lineal de la curva dosis-respuesta para casos agudos (alta tasa) de exposición. Por ello, se puede obtener una curva lineal para rayos X y/o γ a partir de una curva estándar de exposición aguda para rayos X y/o γ , y posiblemente podría usarse como curva estándar para las exposiciones crónicas, con algunas correcciones por la duración de la exposición y la vida útil de los linfocitos. Con radiación de alta LET, los cambios en la tasa de dosis no afectan la frecuencia de DC por unidad de dosis, por lo que la curva obtenida para exposiciones agudas se puede utilizar para exposiciones crónicas o fraccionadas, tomando nuevamente en consideración la duración de la exposición y la vida útil de los linfocitos periféricos.

3.3 Procedimiento para estimar la dosis

La estimación de la dosis recibida mediante DB se obtiene al interpolar la frecuencia de dicéntricas observada en un individuo en una curva de calibración dosis-efecto previamente realizada en el laboratorio (Figura 8). Una estimación de la dosis requiere, por lo tanto, que el análisis de la muestra problema se realice con los mismos criterios que los utilizados en la elaboración de la curva dosis-efecto. Por esto, cada laboratorio de DB tiene que elaborar sus propias curvas de calibración.

Después de una exposición homogénea con RI de baja LET la ionización se distribuye al azar entre las células. Por tanto el daño en el ADN y las AC también se distribuirán al azar. Este es el caso de los rayos X o radiación γ , donde los dicéntricos se ajustan a una distribución de Poisson siendo la varianza (σ^2) igual a la mediana (y).

En radiaciones de alta LET se deposita más energía por unidad de longitud, por lo que el número de eventos es menor a dosis equivalentes. La distribución de AC inducidas no será homogénea (al azar) entre las células, y para una determinada dosis habrá más células con cero AC y más células con múltiples AC que las esperadas en una distribución de Poisson. Es decir, para las radiaciones de alta LET se produce sobredispersión, siendo la varianza (σ^2) más grande que la mediana (y). Esta sobredispersión también se observa en casos de exposición no homogénea a radiaciones de baja LET.

Para evaluar si la distribución de dicéntricos se ajusta a una distribución de Poisson se utiliza el test U, donde N es el número de células analizadas y x el número de dicéntricos:

$$3. \quad U = \left(\left(\frac{\sigma^2}{y} \right) - 1 \right) \sqrt{\frac{N-1}{2(1-1/x)}}$$

U es la unidad normalizada del índice de dispersión (σ^2/y) y en la distribución de Poisson es 1. Si los valores de la U están comprendidos en el intervalo ± 1.96 la distribución se ajusta a una Poisson con un nivel de confianza de $\alpha=0.05$ ²².

En casos de exposiciones homogéneas para estimar la dosis se debe resolver la ecuación 1. Existen incertidumbres que se pueden expresar como el intervalo de confianza del 95% y que provienen tanto del error de muestreo como del error de la curva. Se pueden calcular las dosis del límite superior e inferior (DL y DU) del intervalo de confianza del 95%²³.

Hay casos donde la exposición sólo afecta a una parte del cuerpo (irradiación parcial) y otros en que diferentes partes del cuerpo han estado expuestos a diferentes dosis (irradiación heterogénea). En estos casos se observa que la distribución de dicéntricos por célula se desvía de la Poisson mostrando una sobredispersión (valores de U superiores a 1.96).

En el caso de irradiaciones parciales la dosis recibida por la parte irradiada se puede estimar por el método de la Poisson contaminada²⁴ y por el método Qdr²⁵. Estos métodos no permiten un cálculo eficiente en casos de exposiciones heterogéneas. Recientemente se ha propuesto un nuevo método basado en la mixtura de Poissons para calcular la dosis recibida por la parte o partes irradiadas, tanto en casos de exposiciones parciales como heterogéneas²⁶.

Hay varios programas informáticos como CABAS y Biodose Tools, que se usan para estimar la dosis de forma generalizada.

3.4 Ejemplo de estimación de una dosis homogénea

A continuación se exponen los resultados de una estimación de dosis para dos muestras que habían sido irradiadas con un acelerador lineal (LINAC) de 6 MV (fotones). En las muestras, codificadas como A y B, se analizaron 50 metafases por cada dosis para realizar una estimación en modo de triaje. Las tablas 1 y 2 muestran los resultados del número de dicéntricos obtenidos y de la distribución de los mismos, respectivamente.

TABLA 1. NÚMERO DE DC OBTENIDOS EN 50 CÉLULAS ANALIZADAS DE LAS MUESTRAS A Y B

Código	Número de células analizadas	Número de células normales	Número de dicéntricos	Número de anillos	Número de exceso de acéntricos	Dicéntricos y anillos por célula	Dicéntricos por célula	SE
A	50	17	32	3	10		0,640	0,089
B	50	44	5	0	1		0,100	0,043

TABLA 2. DISTRIBUCIÓN DE DICÉNTRICOS OBTENIDA EN 50 CÉLULAS ANALIZADAS EN LAS MUESTRAS A Y B

Distribución de dicéntricos						
0	1	2	3	4	5	6
22	24	4	0	0	0	0
45	5	0	0	0	0	0

Estos datos fueron introducidos en el programa Biodose Tool, junto con los de la curva de calibración usada, cuyos coeficientes son:

$\alpha \pm \text{SE:}$	0,02104	0,005158
$\beta \pm \text{SE:}$	0,06303	0,004007
$c \pm \text{SE:}$	0,00128	0,0004714

Se obtuvo una estimación de dosis de 3,02 Gy para la muestra A y 1,1 Gy para la muestra B (Tabla 3).

TABLA 3. DATOS DE ESTIMACIÓN DE DOSIS OBTENIDOS PARA LAS MUESTRAS A Y B EN BIDOSE TOOL

Relación entre la varianza y la media	Valor U	Estimación para todo el cuerpo		
		dosis (Gy)	Límite inferior	Límite superior
			errores combinados de Poisson y de la curva de calibración	
0,62	-1,90	3,02	2,45	3,58
0,92	-0,45	1,10	0,54	1,65

Los valores de U están en el intervalo ± 1.96 , por lo que se trata de una exposición homogénea. La dosis real resultó ser de 2,9 Gy para A y de 1,4 Gy para B.

4. CONCLUSIONES

El recuento de cromosomas dicéntricos para estimar la dosis de una exposición es el mejor método para exposiciones recientes y agudas hasta 5 Gy. No obstante, el análisis de dicéntricos presenta ciertas limitaciones. Los cromosomas dicéntricos son mitóticamente inestables y las células portadoras tienden a desaparecer a medida que pasa el tiempo post-irradiación. Otra limitación es el tiempo necesario para tener los resultados ya que el análisis puede requerir varios días. Las técnicas de detección de translocaciones mediante FISH y la técnica de micronúcleos pueden ser alternativas a los dicéntricos.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Bender MA & Gooch PG. Types and rates of X-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiated in vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. 1962; 48(4):522-532.
2. International Atomic Energy Agency. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. IAEA-EPR. (2011). Disponible en: <https://www.iaea.org/publications/8735/cytogenetic-dosimetry-applications-in-preparedness-for-and-response-to-radiation-emergencies>
3. Radiation Effects Research Foundation. A Cooperative Japan-US Research Organization. Disponible en: <https://www.rerf.or.jp/en/>
4. Hall EJ, Giaccia, AJ. Radiobiology for the radiologists. L.W. & Wilkins Philadelphia, 6th Edition 2006.
5. Ward JF. Biochemistry of DNA lesions, Radiat Res. Supplement 1985; 8(2), S103-S111

6. Lenhert S. Biomolecular Action of Ionizing Radiation. Boca Raton. Taylor & Francis Group. 1st Edition 2007. Disponible en : <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9781420011920/biomolecular-action-ionizing-radiation-shirley-lehnert>.
7. Savage JR. Annotation: Classification and relationships of induced chromosomal structural changes, *J. Med. Genet.* 1976; 13: 103–122.
8. Nowell PC. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes, *Cancer Res.* 1960; 20: 462–466.
9. Carstairs K. The human small lymphocyte: its possible pluripotential Quality, *Lancet* 1962; 279: 829–832.
10. Bogen KT. Reassessment of human peripheral T-lymphocyte life span deduced from cytogenetic and cytotoxic effects of radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 64 (1993) 195–204.
11. World Health Organisation. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances, 2009-2010 WHO/HSE/EPR/2008.10, WHO, Geneva (2008).
12. Moorhead PS, Nowell PC, Mellmann WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood, *Exp. Cell Res.* 1960; 20: 613–616.
13. Hungerford DA. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl, *Stain Technol.* 1965; 40: 333–338.
14. Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature* 1974; 251: 156–158.
15. Hayata I, Kajima J, Okabe N. Distribution of metaphases in the 1st cell-cycle for automated-system in radiation-dosimetry, *Radiat. Phys. Chem.* 1992; 39: 517–520.
16. Clare G. The In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test. En: E.M Parry editors. Genetic Toxicology. Methods in Molecular Biology. Parry JM, Human Press; 2012. p.69-91.
17. Introduction to dicentric scoring. MULTIBIODOSE Picture Book. Disponible en: https://whobdn.bfs.de/Level/MBD_PB/index.html
18. Liu J, Li Y, Wilkins R, Flegal F, Knoll J, Rogan PK. Accurate cytogenetic biodosimetry through automated dicentric chromosome curation and metaphase cell selection, *F1000Res.* 2017; 6:1396.
19. Shirley B, Li Y, Knoll J, Rogan PK. Expedited Radiation Biodosimetry by Automated Dicentric Chromosome Identification (ADCI) and Dose Estimation (2017). Disponible en : <https://www.jove.com/v/56245/expedited-radiation-biodosimetry-automated-dicentric-chromosome>.
20. Fabry L, Lemaire M. Dose response relationships for radiation induced chromosome aberrations in human lymphocytes in vivo and in vitro, *Strahlenther Onkol.* 1986; 162(1):63-67.

21. Preston RJ. Biological Dosimetry: Mechanistic concepts. 1ª Reunión Internacional sobre dosimetría biológica, Madrid; 1990. p. 21-24.
22. Savage JRK. Insight into sites, Mutation Res. 1996; 366(2): 81-95.
23. Merkle W. Statistical methods in regression and calibration analysis of chromosome aberration data, Radiat. Environ. Biophys. 1983; 21: 217-233.
24. Dolphin GW. Biological Dosimetry with Particular Reference to Chromosome Aberration Analysis: A Review of Methods. Handling of Radiation Accidents. Proceedings of a Symposium on the Handling of Radiation Accidents. IAEA. Viena; 1969. p. 215-224.
25. Sasaki MS & Miyata H. Biological Dosimetry in Atomic Bomb Survivors, Nature 1968; 220: 1189-1193.
26. Pujol M, Barrios L, Puig P, Caballín MR, Barquinero JF. A New Model for Biological Dose Assessment in Cases of Heterogeneous Exposures to Ionizing Radiation, Radiat Res. 2016;185(2):151-162.