



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Aplicació de la Condensació Prematura de Cromosomes (PCC) a la Dosimetria Biològica

Roser Puig Casanovas

Universitat Autònoma de Barcelona

Gener 2017



Aplicació de la condensació prematura de cromosomes (PCC) a la
dosimetria biològica

Memòria presentada per
Roser Puig Casanovas

Per optar al grau de
Doctora en Biodiversitat

Tesi realitzada sota la direcció de
Dr. Joan Francesc Barquinero Estruch
Dr. Leonardo Barrios Sanromá
Dra. María Rosa Caballín Fernández

al departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia
Facultat de Biociències
Universitat Autònoma de Barcelona

Dr. Joan Francesc
Barquinero Estruch

Dr. Leonardo
Barrios Sanromá

Dra. María Rosa
Caballín Fernández

Roser
Puig Casanovas

Universitat Autònoma de Barcelona
Cerdanyola del Vallès, Gener de 2017

A l'Abril, que s'ha anat fent gran a mida que aquesta tesi ha anat guanyat volum i maduresa, a ella que li he robat tants moments de companyia, i que espero que els seus ulls interrogants de: mama, què fas? trobin algun dia la seva resposta però sobretot que tots els moments perduts serveixin perquè ella trobi en l'estudi el mateix plaer que he trobat jo.

“La ciencia es bella y es por esa belleza que debemos trabajar en ella, y quizás, algún día, un descubrimiento científico como el radio, puede llegar a beneficiar a toda la humanidad”

Marie Curie (1864-1934)

Premi Nobel de física

AGRAÏMENTS

La tesi que teniu a les mans és el resultat de l'esforç i de la recerca a la que m'he abocat al llarg d'uns quants anys de la meva vida, primer com a becària de doctorat, període del que m'emporto un record inestimable, i, ja més tard, robant temps a la meva vida personal, però sempre amb la il·lusió i la convicció que la recerca científica és el millor que aquells que tenim la ocasió i la voluntat de dur-la a terme podem oferir a la societat.

Per aquesta raó, no vull deixar escapar l'oportunitat, en aquestes paraules d'agraïment, d'expressar el meu reconeixement a aquells professors que en el seu moment em van introduir en aquest món laberíntic, que un cop tastat, t'obliga a seguir endavant malgrat les dificultats, les hores de son perdudes, i els moments de dubtes i tribulacions. Així, en primer lloc tinc una menció molt especial pels meus directors de tesi. El Dr. Joan Francesc Barquineró, el Paquito, encapçala aquesta llista que per força haig d'escurçar, ell va ser qui va confiar en mi, qui em va donar la primera oportunitat i qui pràcticament em va donar l'empenta per llançar-me a la recerca facilitant-me la beca de doctorat. Agrair també al Dr. Lleonard Barrios, Leo, i a la Dra. Maria Rosa Caballín, que han pres aquests darrers temps, un paper fonamental en la correcció acurada del text i dels continguts. Gràcies a tots tres pels ànims, l'exigència i la paciència.

En aquesta anys molts han estat els companys i amics que s'han interessat per la meva recerca i que m'han encoratjat a continuar. Entre tots ells, la menció més especial és per la Mònica. Companya i amiga, amb la que he compartit tants moments professionals i personals, moments d'intercanvi d'experiències i de discussions científiques. Però sobretot perquè sempre ha donat a l'Abril, la meva filla, cabassades d'amor i paciència.

No puc oblidar tampoc a la Pilar, quan jo hi vaig arribar ja hi era, aconsellant i comboiant els meus primers passos, i que avui encara hi és, sempre disposada a escoltar i a donar un cop de mà.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	17
1.1. Radiacions ionitzants.....	19
1.1.1. Definició i tipus de radiació	19
1.1.2. Unitats de mesura	20
1.2. Efectes biològics de les radiacions ionitzants	23
1.2.1. Interacció de les radiacions ionitzants amb el DNA	23
1.2.2. Resposta cel·lular al dany radio-induït.....	26
1.2.2.1. Detecció del dany i resposta cel·lular.....	26
1.2.2.2. Reparació del DNA.....	27
1.2.2.3. Punts de control del cicle cel·lular.....	29
Punt de control G1/S	31
Punt de control de la fase S.....	32
Punt de control G2/M.....	34
1.3. Dosimetria biològica.....	36
1.3.1. Formació i tipus d'alteracions cromosòmiques.....	37
1.3.2. Elaboració de corbes dosi-efecte	39
1.3.3. Estimació de la dosi	41
1.3.3.1. En casos d'exposició homogènia.....	41
1.3.3.1. En casos d'exposició parcial.....	42
1.3.4. Limitacions de la dosimetria biològica	43
1.4. Condensació prematura de cromosomes	46
2. OBJECTIUS	51
3. RESULTATS	55

3.1. <u>Treball 1.</u> Puig, R., Barrios, L., Pujol, M., Caballín, M. R. & Barquinero, J. F. (2013). Suitability of scoring PCC rings and fragments for dose assessment after high-dose exposures to ionizing radiation. <i>Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis</i> , 757(1), 1–7.....	57
3.1. <u>Treball 2.</u> Puig, R., Pujol, M., Barrios, L., Caballín, M. R. & Barquinero, J. F. (2016). Analysis of α -particle-induced chromosomal aberrations by chemically-induced PCC. Elaboration of dose-effect curves. <i>International Journal of Radiation Biology</i> , 92(9), 493-501.....	67
4. DISCUSSIÓ	77
4.1. Cèl·lules amb diferents tipus de morfologies cromosòmiques observades amb la tècnica de PCC	80
4.2. Freqüència d'alteracions cromosòmiques en les cèl·lules amb diferents morfologies.....	84
4.2.1. Cromosomes en anell	84
4.2.2. Fragments cromosòmics extra.	87
4.2.3. Cromosomes dicèntrics.	88
4.3. Corbes dosi-efecte per les diferents alteracions cromosòmiques.....	90
4.3.1. Cromosomes en anell	90
4.3.2. Fragments cromosòmics extra.	93
4.3.3. Cromosomes dicèntrics.	95
4.4. Validació de les corbes dosi-efecte de raigs γ amb simulacions d'irradiacions parcials.....	96
4.5. Valoració del marcador més adequat per a l'estimació de la dosi	97
5. CONCLUSIONS	99
6. BIBLIOGRAFIA	105

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Radiacions ionitzants

1.1.1. Definició i tipus de radiació

La radiació és l'emissió d'energia que es propaga en qualsevol medi en forma d'ones o partícules, i s'anomena radiació ionitzant (RI) quan té prou energia per provocar la ionització dels àtoms i molècules del medi que travessa.

Des del descobriment dels raigs X al 1895 per Wilhelm Conrad Röntgen, les RI s'utilitzen en aplicacions mèdiques i industrials. En l'àmbit mèdic, s'utilitzen tant en el diagnòstic com en el tractament de malalties. En l'indústria s'apliquen en la radiografia industrial, en l'esterilització i en el control de plagues entre d'altres. A més, a les centrals nuclears s'aprofita el fenomen de fissió nuclear per obtenir electricitat.

Les RI es poden transmetre en forma d'ones electromagnètiques, com els raigs X o els raigs γ , o en forma corpuscular, com les partícules amb massa, ja siguin amb càrrega (partícules α o β) o sense càrrega (neutrons). Els diferents tipus de RI tenen diferent poder de penetració en la matèria que travessen (Figura 1). Els raigs X i els raigs γ tenen un gran poder de penetració, podent travessar el cos humà. Els neutrons també tenen un poder de penetració molt alt comparat amb altres partícules amb carrega de la mateixa massa i energia. En canvi, les partícules α i les partícules β tenen un poder de penetració molt baix, les primeres només són capaces de recórrer alguns centímetres en l'aire i algunes micres en el teixit viu i les segones poden penetrar fins a 1-2 centímetres en el teixit viu.

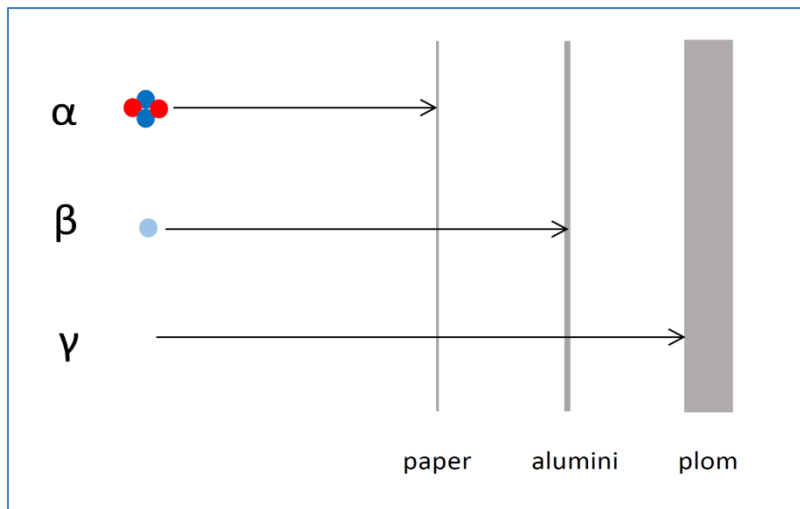


Figura 1. Representació del poder de penetració dels diferents tipus de RI. Una partícula alfa, no pot travessar un full de paper, un full d'alumini impedeix el pas d'una partícula β, i els fotos s'absorbeixen amb el plom. Adaptada de <http://commons.wikimedia.org>.

1.1.2. Unitats de mesura

En radioprotecció una de les mesures principals és la *dosi absorbida (D)*, que és l'energia dipositada en un medi per unitat de massa (equació 1).

$$(1) \quad D = \frac{d\varepsilon}{dm}$$

On D és el quocient entre l'energia mitjana impartida per la RI a la matèria ($d\varepsilon$) i la massa de la matèria (dm). En el sistema internacional la unitat de D és el *Gray (Gy)*, que equival a un Joule per quilogram (J/Kg).

Els diferents tipus de RI dipositen l'energia de manera diferent al llarg de la seva trajectòria (Figura 2). En aquest sentit, la *transferència lineal d'energia (LET)* representa l'energia absorbida pel medi per unitat de longitud de la trajectòria, i s'expressa en KeV/ μ m.

Les RI es poden classificar en:

- Radiacions de baixa LET: generen pocs successos ionitzants per unitat de longitud, com els raigs X o els raigs γ .
- Radiacions d'alta LET: produeixen moltes ionitzacions per unitat de longitud, com les partícules α , β i els neutrons.

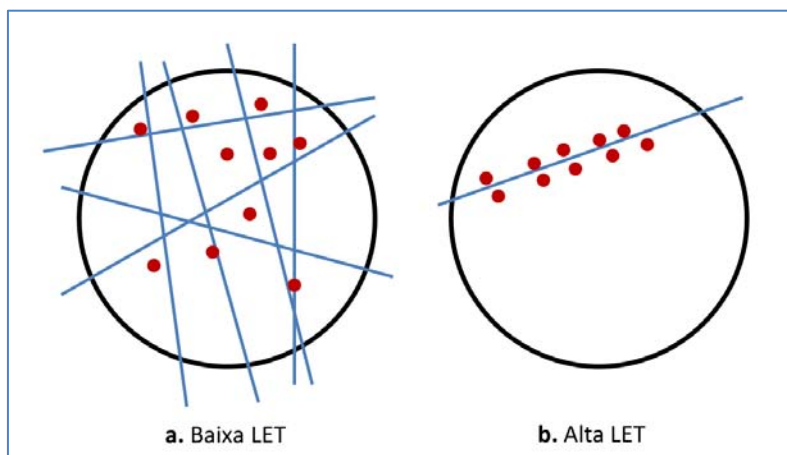


Figura 2. Representació esquemàtica de la distribució de l'energia per diferents tipus de radiacions. **a.** Radiacions de baixa LET. **b.** Radiacions d'alta LET. Adaptada de Radiation Effects Research Foundation <http://www.rerf.jp/>.

Degut a la LET, una mateixa D de diferents tipus de RI pot produir un efecte biològic diferent. És per això que en radioprotecció s'ha definit el concepte d'*eficàcia biològica relativa* (RBE). L'RBE és el quocient que relaciona la dosi d'una radiació problema amb la dosi d'una radiació de referència, normalment els raigs X de 250 KeV, que produeix el mateix efecte biològic.

INTRODUCCIÓ

Per tenir en compte tant la D com l'RBE, es va introduir el concepte de la *dosi equivalent* (H), sent la seva unitat de mesura el Sievert (Sv). Un Sv és la quantitat de radiació que produeix el mateix efecte biològic que 1 Gy de raigs X o γ . La H de cada tipus de radiació s'obté multiplicant la D per un factor de ponderació (w_R), aquest factor l'estableix la Comissió Internacional de Protecció Radiològica (ICRP) per a cada tipus de radiació en base a dades experimentals sobre les seves RBEs (Taula 1).

Taula 1. Valors de w_R recomanats per la ICRP-103 (2007).

Tipus de radiació	Energia	w_R (ICRP-103)
Fotons	Totes	1
Electrons i muons	Totes	1
Protons i pions carregats	Totes	2
Neutrons	<1 MeV	Funció
Neutrons	1-50 MeV	Funció
Neutrons	>50 MeV	Funció
Partícules α , fragments de fissió, nuclis pesats	Totes	20

El factor de ponderació dels neutrons depèn de la seva energia i per això es calcula amb una funció contínua, que varia per neutrons de baixa, mitjana o alta energia.

1.2. Efectes biològics de les radiacions ionitzants

Poc després del descobriment dels raigs X i de la radioactivitat, van aparèixer les primeres evidències que mostraven que les RI eren perjudicials per la salut. Inicialment es van observar efectes sobre els teixits exposats, com l'epilació i els eritemes cutanis. Més tard, es va evidenciar que l'exposició a RI podia provocar càncer, i que l'exposició de les cèl·lules germinals podia provocar efectes en la descendència.

Tradicionalment, els efectes sobre la salut s'han classificat en determinístics i estocàstics. Els primers són aquells que impliquen una disfunció o pèrdua funcional dels teixits o òrgans i són deguts principalment al dany cel·lular. Per qualsevol efecte determinístic, la dosi es relaciona amb la severitat de l'efecte i existeix una dosi llindar per sota la qual no s'observa l'efecte. En canvi, els efectes estocàstics generalment es manifesten temps després de l'exposició i inclouen un augment del risc de desenvolupar càncer i malalties hereditàries. Pels efectes estocàstics la dosi es relaciona amb la probabilitat d'aparició de l'efecte i no existeix una dosi llindar.

1.2.1. Interacció de les radiacions ionitzants amb el DNA

Les RI poden produir dany en el DNA de manera directa o indirecta (Figura 3). Es parla d'acció directa quan qualsevol de les formes de radiació, ja siguin fotons, neutrons o partícules amb càrrega, interaccionen directament amb la molècula de DNA causant la seva ionització i iniciant una cadena d'esdeveniments que donaran lloc a un canvi en la seva estructura. L'acció directa és el procés dominant en les radiacions d'alta LET, com els neutrons o les partícules alfa.

INTRODUCCIÓ

L'acció de les RI sobre el DNA també pot ser de manera indirecta. Les RI poden interactuar amb altres àtoms i molècules de la cèl·lula, particularment l'aigua, provocat la seva excitació o ionització. En el cas de la radiòlisi de l'aigua, es formen molècules (H_2 , H_2O_2), ions (H_2O^+ , H_2O^- , H_3O^+), així com radicals lliures ($H\cdot$, $\cdot OH$, $H_2O\cdot$) entre d'altres. Alguns d'aquests productes són altament reactius i poden interaccionar químicament amb el DNA produint canvis en la seva estructura. S'estima que dues terceres parts del dany produït pels raigs X en el DNA de cèl·lules de mamífer està causat per l'acció indirecta.

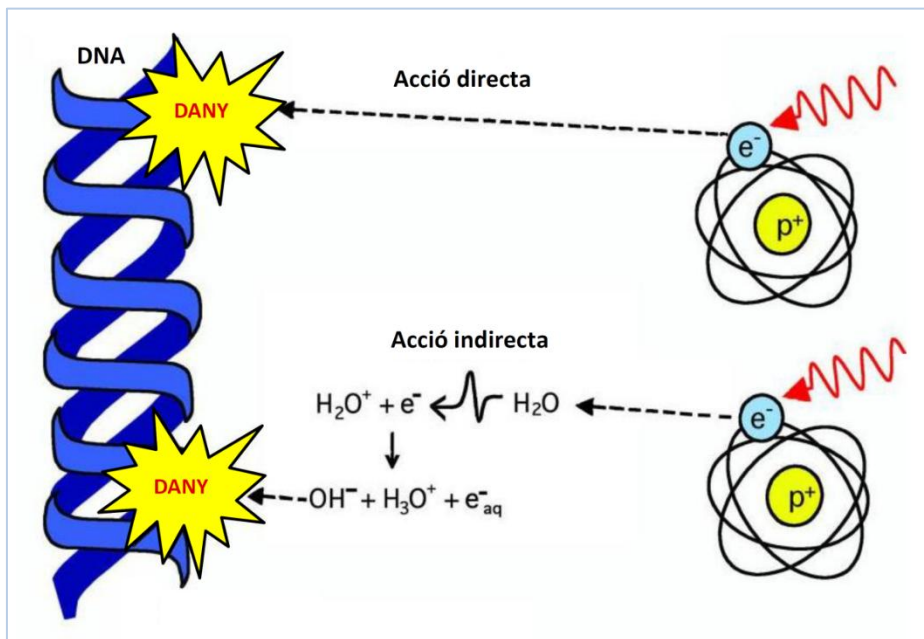


Figura 3. Esquema representatiu de l'acció directa i indirecta de les RI sobre el DNA. En l'acció indirecta, els radicals lliures generats com a resultat de la radiòlisi de l'aigua seran els que interaccionaran amb el DNA. Adaptat de Hall & Giaccia (2006).

A nivell molecular, les RI produeixen diferents tipus de lesions en el DNA, com per exemple danys de base (*Base Damage*, BD), trencaments de cadena simple (*Single Strand Break*, SSB), llocs abàsics (*Abasic Site*, AS), unions DNA-proteïna (*DNA-protein cross-link*, DPC), i trencaments de doble cadena

(*Double Strand Break*, DSB). Aquestes lesions són lesions simples. Quan diverses lesions simples coincideixen en un segment curt de DNA es consideren lesions complexes o clústers de dany (Figura 4)(Ward 1981; 1985).

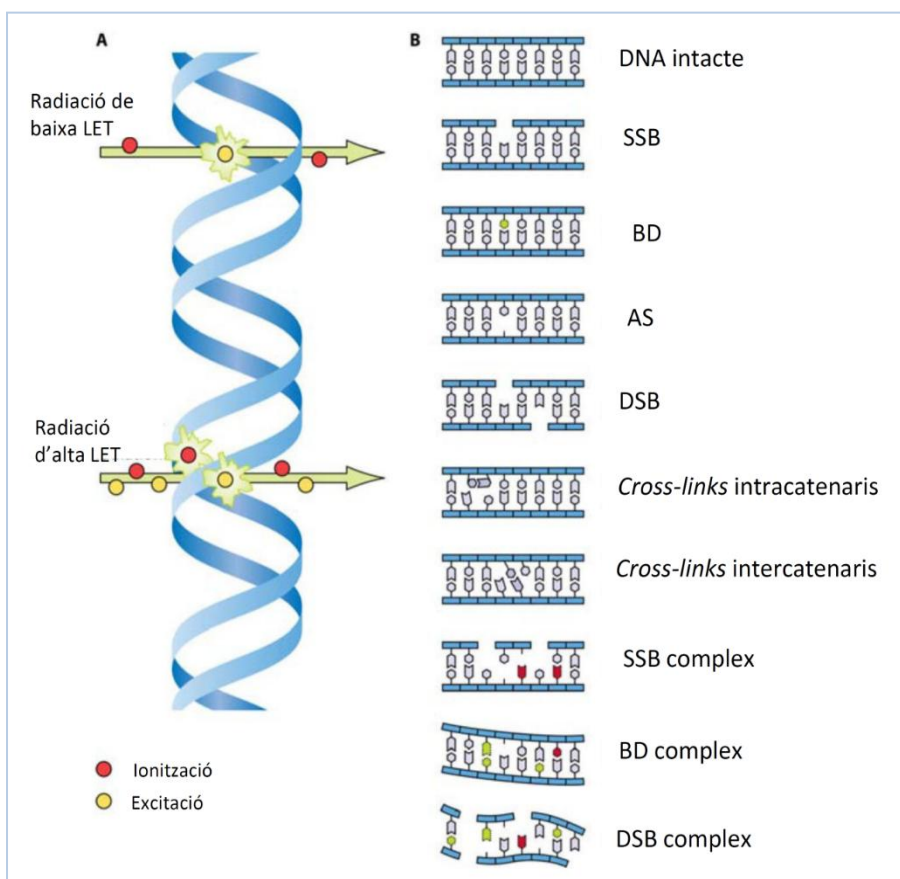


Figura 4. A. Interacció de les RI de baixa i alta LET amb el DNA. **B.** Tipus de lesions radio-induïdes en la molècula de DNA. Modificat de IAEA (2011).

El número de lesions induïdes en el DNA per a una dosi d' 1 Gy de RI de baixa LET és aproximadament d'uns 1000 danys de base (BD), uns 1000 SSB i uns 40 DSB (Hall & Giaccia 2006). Els DSB són les lesions primàries crítiques en la formació de les alteracions cromosòmiques i juguen un paper molt important en la mort cel·lular (Lenhert 2008).

1.2.2. Resposta cel·lular al dany radio-induït.

1.2.2.1. Detecció del dany i resposta cel·lular

Quan es produeix dany en el DNA, les cèl·lules, mitjançant una sèrie de mecanismes anomenats de forma conjunta *DNA-damage response* (DDR), poden detectar les lesions, senyalitzar-les i promoure la seva reparació (Jackson & Bartek 2010). La DDR també actua a través de mecanismes complexos de control del cicle cel·lular, i quan el dany és massa gran per a ser reparat amb fidelitat, activa mecanismes de mort cel·lular (Polo & Jackson 2011).

De manera general, els DSBs es detecten mitjançant el complex MRE11-RAD50-NSB1 (MRN) que s'uneix al DNA i recluta la proteïna cinasa ATM. ATM fosforila la Ser 139 de la histona H2AX (γ H2AX), i aquesta recluta la proteïna medidora "DNA damage checkpoint 1" (MDC1), que amplifica el senyal de la DDR vèries megabases al voltant del DSB mitjançant l'acumulació de més complex MRN que al seu torn activa més ATM. La proteïna BRCA1 també és fosforilada per ATM i reclutada a la zona del DNA on hi ha el dany. La "p53-binding protein 1" (53BP1) també està involucrada en el manteniment de la DDR reforçant l'activació d'ATM. Per altre banda, la proteïna cinasa CHK2, també activada per ATM, és la responsable d'activar la P53 i d'inhibir la CDC25, el que pot dur a l'aturada del cicle cel·lular, donant temps a la reparació del DNA o a iniciar el procés d'apoptosi (Figura 5).

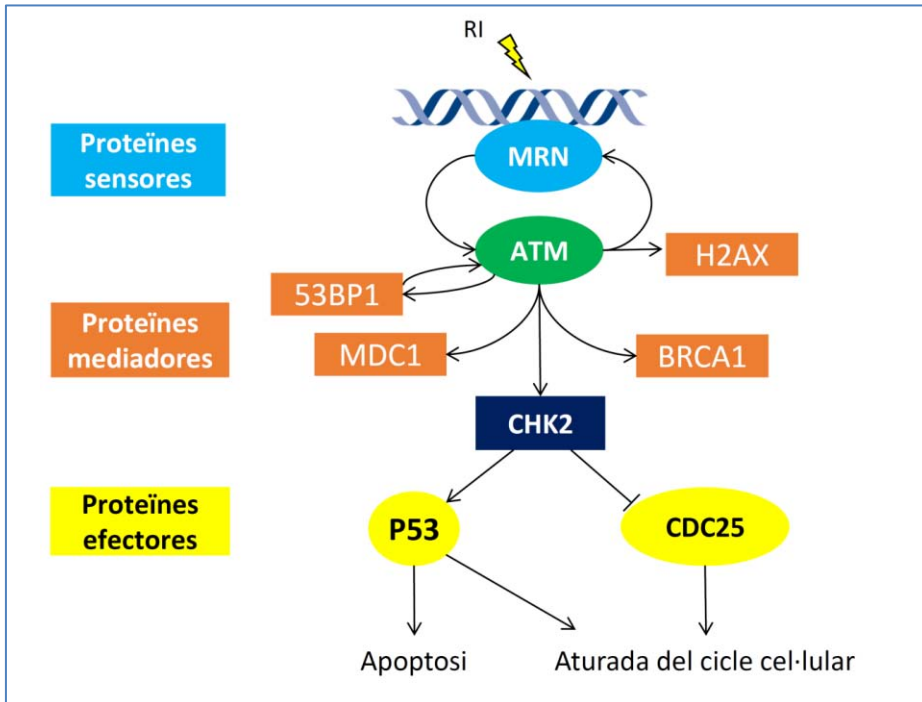


Figura 5. Detecció dels DSBs i resposta cel·lular. El complex MRN detecta els DSBs i recluta ATM que fosforila la histona H2AX (γ H2AX) en la regió del dany en el DNA. ATM també activa la proteïna cinasa CHK2, que activa P53 i inhibeix CDC25. Modificat de Sulli et al. (2012).

1.2.2.2. Reparació del DNA

Depenent del tipus de dany en el DNA, en la cèl·lula actuen diferents mecanismes de reparació. Els processos anomenats *Base Excision Repair* (BER), *Nucleotid Excision Repair* (NER) i la reparació de trencaments de cadena simple (SSBR), reparen danys de base, llocs apurínics i SSBs respectivament. Per altre banda, els mecanismes involucrats en la reparació dels DSBs són majoritàriament la reparació per recombinació homòloga (HRR) i la reparació per la unió d'extremes no homòlegs (NHEJ) (Hall & Giaccia 2006; Wyman & Kanaar 2006; Mladenov & Iliakis 2011) (Figura 6).

INTRODUCCIÓ

El mecanisme de la HRR restitueix la seqüència original del DNA on s'ha produït el DSB, utilitzant la cromàtide germana no danyada com a motlle per a sintetitzar els fragments alterats i processats de la cromàtide trencada. En aquesta via, el complex MRN està implicat en el processament del trencament i reclutament de les proteïnes RPA, RAD51 i RAD52. El primer pas implica la formació d'una regió de cadena simple de DNA, mitjançant un processament nucleotídic per part del complex MRN (amb activitat helicasa i exonucleasa). RAD51 polimeritza sobre aquesta cadena formant un filament nucleoproteic amb l'ajuda de proteïnes d'unió al DNA de cadena simple (RPA i RAD52), que envaeix la regió homòloga de la cromàtide germana. Finalment, una DNA-polimerasa, una DNA-ligasa i les resolvases repararan fidelment el DSB (San Filippo et al. 2008). Aquest mecanisme necessita d'una doble cadena homòloga intacta com a motlle, i per tant, actua un cop el DNA s'ha replicat, al final de la fase S i durant G2.

El NHEJ és un mecanisme de reparació que processa els extrems del trencament i els uneix directament. Quan es produeix un DSB, l'heterodímer format per les proteïnes KU70 i KU80 s'uneix als extrems del DSB i recluta les proteïnes DNA-PKcs. Aquestes fosforilen i activen proteïnes de reparació addicionals, incloent ARTEMIS que té activitat endonucleasa. ARTEMIS juntament amb el complex MRN processen els extrems trencats sobre els que actuen successivament les polimerases i el complex XRCC4-XLF/NHEJ1-ligasaIV amb activitat lligasa (Lieber 2010). Aquest mecanisme pot actuar durant tot el cicle cel·lular, i en mamífers és el mecanisme predominant de reparació dels DSBs. Quan els extrems dels DSBs es reuneixen de manera errònia, o no es reparen, es formen les alteracions cromosòmiques (AC).

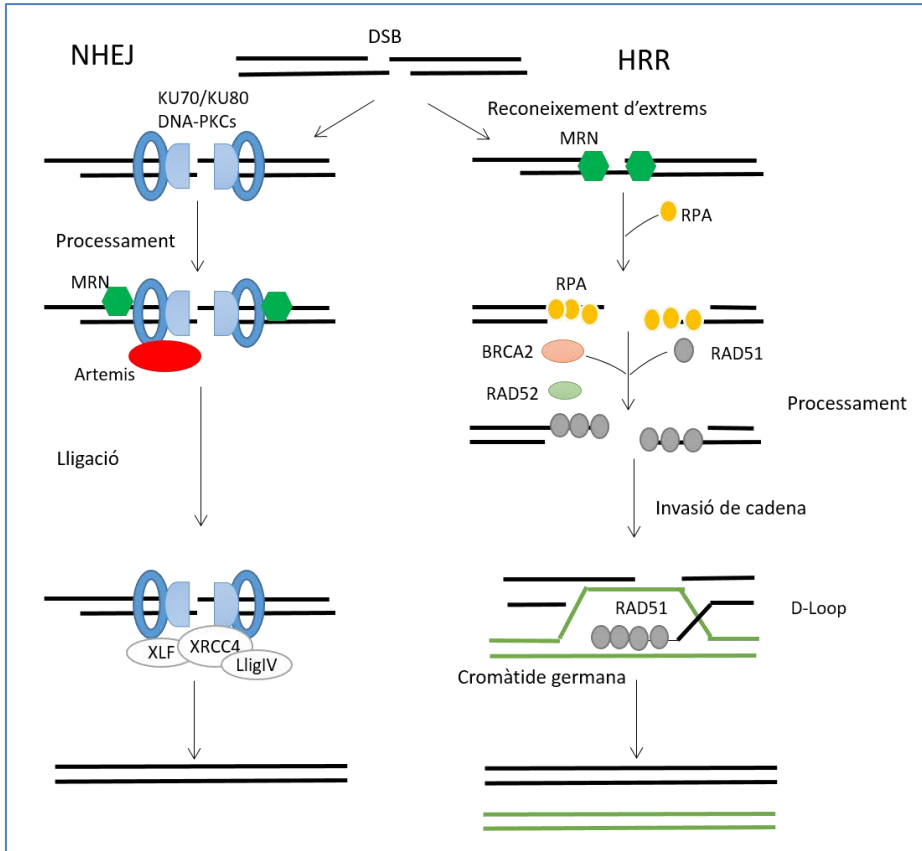


Figura 6. Mecanismes de reparació dels DSBs. A l'esquerra, es mostra la via de reparació per la unió d'extremes no homòlegs (NHEJ), procés que pot actuar en qualsevol moment del cicle cel·lular i que en mamífers és el procés predominant. La via de la dreta, mostra la reparació per recombinació d'homòlegs (HRR), aquesta via es dona durant la fase S i la G2, ja que necessita la cromàtide germana. Modificat de Lans et al. (2012).

1.2.2.3. Punts de control del cicle cel·lular

La progressió del cicle cel·lular està controlada en diferents punts de control per tal d'assegurar la màxima integritat del DNA i la correcta segregació cromosòmica a les cèl·lules filles. Els principals punts de control es troben al final de la fase G1 (G1/S), a la fase S (intra-S), al final de la fase G2 (G2/M) i en la transició metafase/anafase, abans de la segregació cromosòmica. Si es

INTRODUCCIÓ

detecta dany en el DNA, una replicació incompleta o una anomalia en l'estructura del fus mitòtic, la progressió del cicle cel·lular es pot bloquejar en aquests punts de control (Figura 7).

A nivell molecular, la progressió del cicle cel·lular està controlada per les proteïnes cinases (CDKs), i la seva activitat i especificitat depèn de la presència d'unes subunitats reguladores, les ciclines.

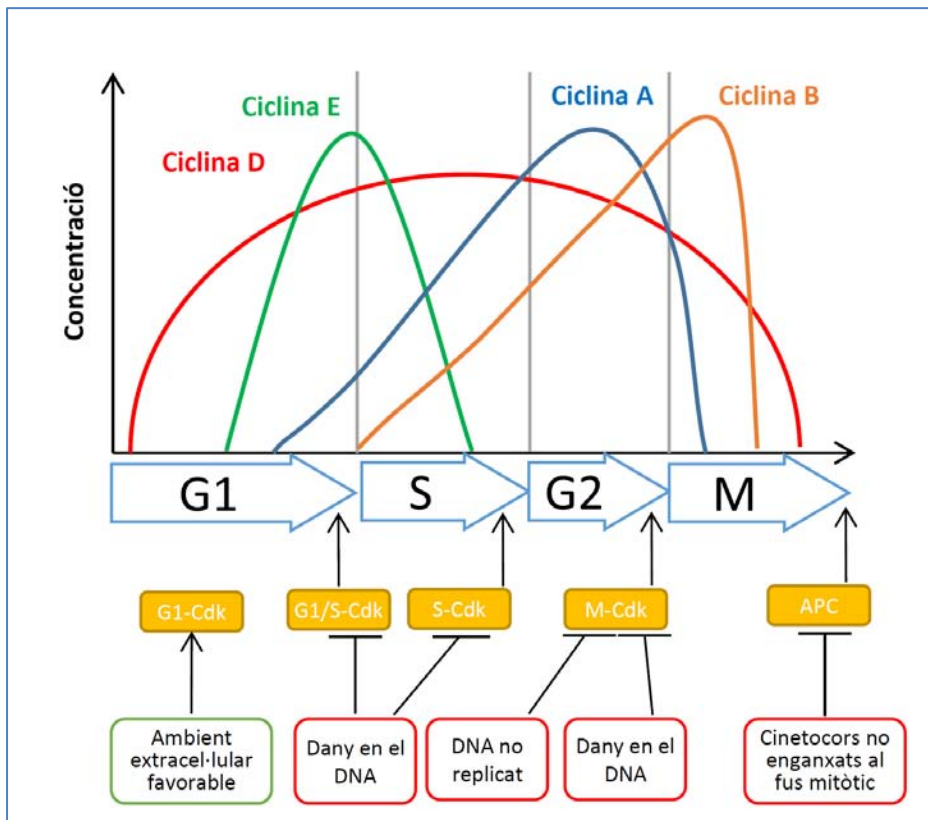


Figura 7. Expressió de les ciclines al llarg del cicle cel·lular i visió general del control del cicle cel·lular. Esquema modificat de Boundless 2015 i Alberts 2014.

La cèl·lula utilitza cicles de síntesis i degradació de les ciclines per controlar l'activitat de les CDKs (Figura 7). En aquest control també intervenen proteïnes inhibidores de les CDKs, com per exemple les proteïnes RB, P53 i P21.

Punt de control G1/S

Quan les condicions són favorables, la transició de G1 a S és estimulada per mitògens. La progressió en aquest punt és dona gràcies a l'activació seqüencial de CDK4/6-Ciclina D i de CDK2-Ciclina E. L'entrada a la fase S requerirà la inactivació de la proteïna del Retinoblastoma (pRB) i l'activació de la cinasa promotora de la fase S (CDC45). Els complexos CDK-Ciclina fosforilen la proteïna RB, alliberant el factor de transcripció E2F que promou la transcripció de gens necessaris per la fase S. E2F alhora també activa la transcripció de la Ciclina E promovent una retroalimentació positiva que, un cop superat el punt de restricció (punt R) a final de G1, ja no fa necessària la presència de mitògens per entrar a la fase S.

Aquest punt de control és important per prevenir l'entrada de les cèl·lules danyades a la fase S. Quan es produeix un dany en el DNA, el punt de control G1/S opera per dues vies. Una via ràpida i inicial, en que la CHK2 fosforila la CDC25 que serà degradada per ubiquitinització. La inactivació de CDC25 priva a la cèl·lula de l'activador central del complex CDK2-Ciclina E. La segona via es dona per l'estabilització i activació de l'activitat transcripcional de la proteïna P53. La fosforilació de MDM2 per part de ATM fa que es s'alliberi P53 que alhora activa l'expressió de P21. Aquesta s'unirà als complexos CDK2-Ciclina E i CDK4/6-Ciclina D inactivant-los (Figura 8) (Iliakis et al. 2003; Deckbar et al. 2011).

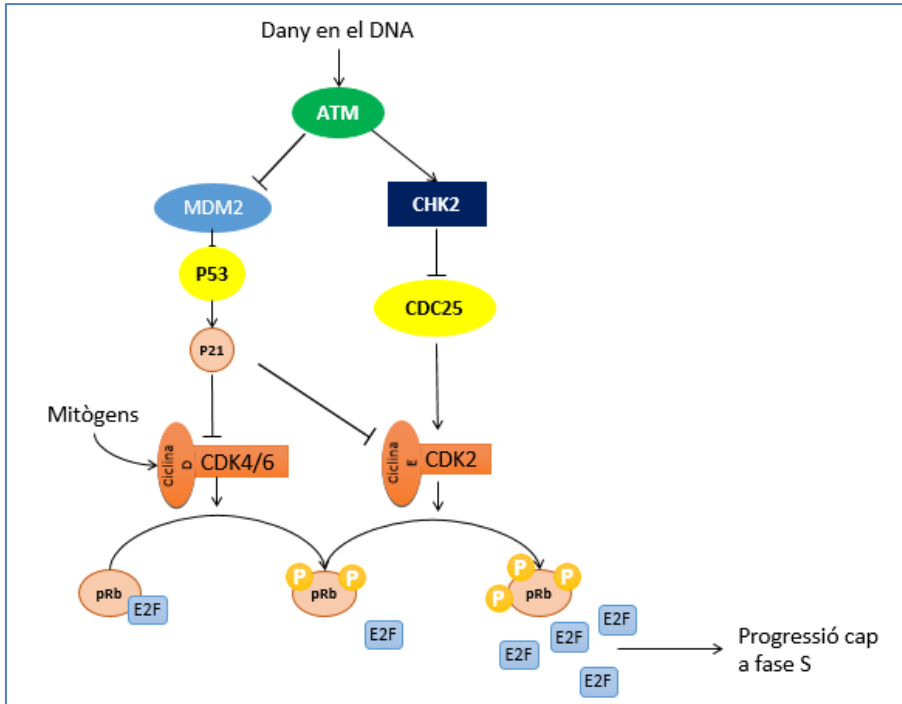


Figura 8. Principals vies del punt de control G1/S. Quan es produeix un dany en el DNA, el punt de control G1/S opera per dues vies. Una via ràpida i inicial, mitjançant la degradació de la fosfatasa CDC25, i una segona via per estabilització de la proteïna p53. Modificat de Iliakis et al. (2003).

Punt de control de la fase S

La presència de dany en el DNA durant la fase S pot no aturar completament la seva síntesis (Iliakis et al. 2003; Willis & Rhind 2009), però activa ATM que fosforila diferents substrats, entre ells CHK2. CHK2 fosforila CDC25 causant la seva degradació proteolítica i privant a la cèl·lula de l'activitat CDK2-Ciclina E. Així, s'inhibeix la proteïna cinasa CDC45, factor essencial en els punts d'inici de la replicació (ORI).

INTRODUCCIÓ

Punt de control G2/M

La cinasa CDK1 és un efector clau en el punt de control G2/M. L'activació d'aquesta cinasa per l'associació de la ciclina B forma el factor promotor de la mitosi (MPF) que és imprescindible per iniciar la mitosi.

Durant la fase G2, el MPF es manté inactiu degut a la seva fosforilació per part de les cinases WEE1 i MYT1. Per entrar a la mitosis, es requereix la desfosforilació del MPF per part de la CDC25C. Quan es produeix un dany en el DNA, ATM i ATR fosforilen i activen les proteïnes cinases CHK2 i CHK1 respectivament, que al seu torn inhibeixen la CDC25C impedit l'activació del MPF.

Un altre nivell de regulació es dona a través de les proteïnes PLK1 i PLK3. PLK1 és un regulador positiu de l'activitat de la CDC25 i en les cèl·lules sense dany en el DNA promou l'entrada a la mitosi mitjançant la seva fosforilació. S'ha postulat que ATR i ATM inactiven per fosforilació PLK1. Per altre banda, PLK3 s'activa per la presència de dany en el DNA, és ATM-depenent i inhibeix per fosforilació l'activitat de CDC25.

Una segona cascada més lenta, i que es dona en paral·lel, implica la fosforilació de P53 i la subseqüent dissociació de MDM2, permetent la transcripció de gens regulats per P53 com P21, que inhibeix CDK1 i per tant MPF.

Hi ha evidències que BRCA1 també està implicat directament en el retard de l'entrada a la fase M, ja sigui a través de ATM/ATR o per fosforilació directa de CHK1 (Figura 10) (Iliakis et al. 2003; Deckbar et al. 2011).

Finalment, en el darrer punt de control, el de la sortida de la mitosi, la cèl·lula comprova la unió de tots els cinetocors al fus mitòtic, per tal d'assegurar la correcta segregació dels cromosomes en l'anafase.

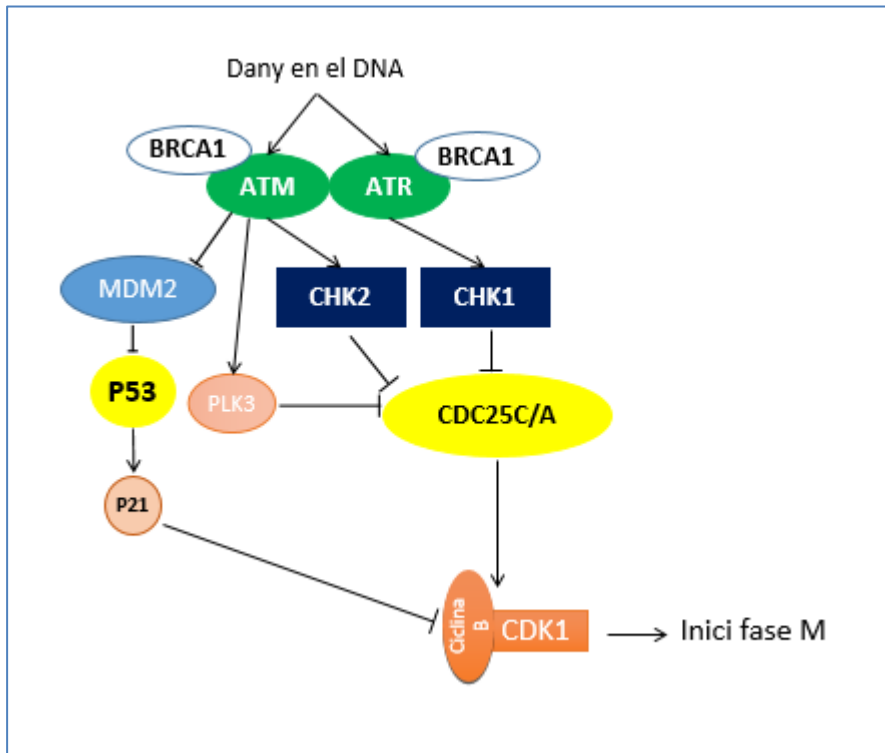


Figura 10. Organització molecular del punt de control G2/M. Un punt central en la regulació és la inhibició de la fosfatasa CDC25. Diversos processos que intervenen en el bloqueig de la cèl·lula en G2 degut a la RI actuen inhibint la CDC25. Modificat de Iliakis et al. (2003).

1.3. Dosimetria biològica

La protecció radiològica té com a objectiu establir un nivell adequat de protecció per a les persones i pel medi ambient en front dels efectes perjudicials de l'exposició a les RI. En un context d'exposició a RI, la determinació de la dosi rebuda és essencial per predir la severitat clínica dels efectes determinístics, i decidir el tractament més adequat. Per altre banda,

INTRODUCCIÓ

en els estudis epidemiològics la determinació precisa de la dosi rebuda és essencial per establir la relació amb els efectes estocàstics.

Es defineix com a dosimetria biològica (DB), l'estimació de la dosi rebuda per un individu a partir de l'anàlisi d'un paràmetre biològic que varia quantitativament amb la dosi (Bender & Gooch 1962; IAEA 2011) .

L'estimació del risc s'ha de basar en una avaluació acurada de la dosi d'exposició i de la seva distribució en el cos. En casos d'exposició interna, l'estimació de la dosi es pot fer mitjançant un comptador de cos sencer , o bé a partir de la detecció de la presència de radionúclids en l'orina. En casos d'exposició externa, les dosis són rutinàriament mesurades mitjançant un dosímetre físic. La DB permet estimar la dosi en casos de accidents radiològics i en personal ocupacionalment exposat permet estimacions complementaries a la dosimetria física. En casos de sobreexposicions parcials o heterogènies, el dosímetre físic pot ser poc informatiu i la DB pot permetre una estimació més acurada de la dosi.

Les AC són el biomarcador més sensible i més àmpliament utilitzat per estimar la dosi d'una exposició a RI. A més, l'anàlisi de les AC ha servit per avaluar altres aspectes molt importants en radiobiologia, com són: els mecanismes de producció del dany genètic, els mecanismes cel·lulars de resposta al dany induït, l'eficàcia biològica relativa i la susceptibilitat interindividual a les RI.

1.3.1. Formació i tipus d'alteracions cromosòmiques

Quan diversos DSBs coexisteixen en l'espai i en el temps la seva reparació pot restituir els cromosomes originals, però si la reparació es realitza de manera errònia o no es realitza, pot donar lloc a la formació d'AC (Figura 11).

Les AC es poden classificar de diverses formes. Segons si l'alteració afecta a una o a les dues cromàtides del cromosoma, serà de **tipus cromatídic** o de **tipus cromosòmic** respectivament. A més, les alteracions de tipus cromosòmic, es poden classificar en **intracromosòmiques**, quan impliquen un sol cromosoma, com ho són les delecions, inversions i cromosomes en anell (Figura 11 a i b), o **intercromosòmiques**, quan impliquen dos o més cromosomes, com ho són les translocacions, insercions i els cromosomes dicèntrics (Figura 11c).

Una altra manera de classificar les alteracions cromosòmiques és segons el número mínim de trencaments necessaris per a la seva formació. En aquest sentit es poden classificar en **alteracions simples**, quan es formen per dos trencaments en un o dos cromosomes, i en **alteracions complexes** quan requereixen tres o més trencaments en dos o més cromosomes. Malgrat que amb tinció uniforme es poden detectar algunes alteracions complexes, com per exemple els cromosomes amb tres centròmers (tricèntrics), moltes alteracions simples i complexes passen desapercibudes. Per detectar una major varietat d'alteracions complexes cal aplicar tècniques d'hibridació *in-situ* fluorescent (FISH).

Les AC també es poden classificar segons el seu comportament en la segregació cromosòmica, distingint-se entre **alteracions inestables** o **estables**. Les primeres donen problemes de segregació durant la mitosi i inclouen els cromosomes dicèntrics, els cromosomes en anell i els fragments acèntrics. Aquestes alteracions són fàcilment identificables amb tinció uniforme i són les que s'utilitzen en DB en casos d'exposicions recents i agudes. Les alteracions estables no donen problemes de segregació durant la mitosi i es mantenen durant successives divisions cel·lulars, podent-se detectar temps després de l'exposició a la RI. Entre les alteracions considerades estables hi ha les translocacions, les inversions i les insercions.

INTRODUCCIÓ

Les translocacions recíproques es poden detectar amb tècniques de FISH, i es consideren un bon biomarcador d'exposicions cròniques o passades.

Per últim, si tots els extrems trencats es reuneixen, les AC s'anomenen **alteracions completes**. En canvi, quan un o més extrems d'un DSB no es reuneixen, les AC s'anomenen **incompletes**.

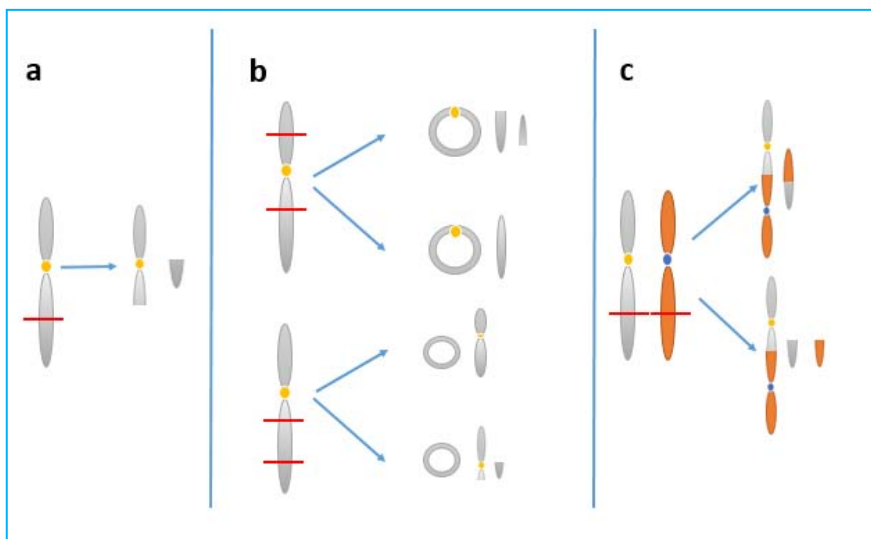


Figura 11. Alteracions cromosòmiques que es poden detectar amb tinció uniforme. **a:** cromosoma no reparat. **b:** a la part superior, formació d'un cromosoma en anell centric i a la part inferior, formació d'un cromosoma en anell acentric. **c:** formació de cromosomes dicèntrics.

1.3.2. Elaboració de corbes dosi-efecte

Convencionalment, l'anàlisi de les AC radio-induïdes es realitza en metafases de primera divisió mitòtica de limfòcits de sang perifèrica. Durant molts anys, el recompte de cromosomes dicèntrics ha estat el mètode més utilitzat i encara ara, és el mètode més fiable, ja que la seva freqüència basal en individus és molt baixa, de 1-2 cromosomes dicèntrics cada 1.000 cèl·lules, i mostren una bona relació dosi-resposta (IAEA 2011).

Per radiacions de baixa LET i per dosis de fins a 5Gy, la relació dosi-efecte per als cromosomes dicèntrics s'ajusta un model lineal- quadràtic (equació 2) (Lea & Catheside 1942):

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

On, Y és la freqüència de dicèntrics esperada després d'una exposició a una dosi D, C és el coeficient que representa la freqüència basal de dicèntrics, i α i β els coeficients lineal i quadràtic respectivament.

Els valors C, α i β s'obtenen de l'ajust a la funció lineal-quadràtica de les freqüències de dicèntrics observades després d'irradiar limfòcits de sang perifèrica a diferents dosis.

La freqüència de dicèntrics també depèn de la taxa de dosi i de la LET de la radiació (Natajaran & Obe 1983). Tal i com ja s'ha indicat, per formar un cromosoma dicèntric són necessaris com a mínim dos trencaments en dos cromosomes. Per radiacions de baixa LET, els dos trencaments poden estar produïts per una o dues trajectòries de radiació. Els dicèntrics formats per una trajectòria estarien representats pel component lineal αD de la funció, mentre que els dicèntrics formats per dues trajectòries estarien representats pel component quadràtic βD^2 .

Per les radiacions de baixa LET, a mesura que disminueix la taxa de dosi, el coeficient β tendeix a desaparèixer. Per les radiacions d'alta LET predomina el component lineal αD , ja que una trajectòria és capaç de produir els dos trencaments, i el coeficient β tendeix a zero. Així, per les radiacions d'alta LET, la relació entre la dosi i la freqüència de dicèntrics esdevé una funció lineal (equació 3) (Figura 12) (Preston 1990).

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

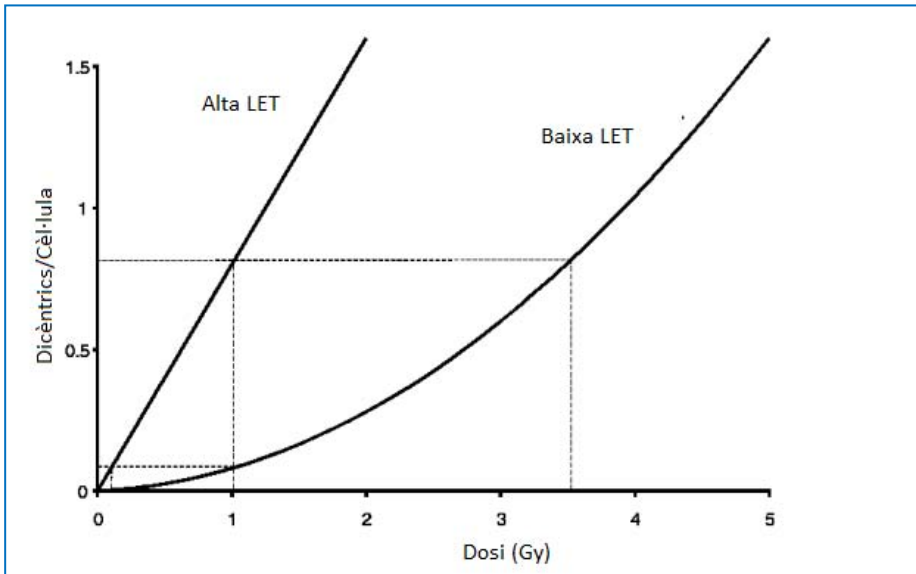


Figura 12. Representació de les corbes dosi-efecte per alta i baixa LET. Figura adaptada de IAEA (2011).

L'estimació de la dosi rebuda mitjançant DB es basa en interpolar la freqüència de dicèntrics observada en un individu a una corba de calibració dosi-efecte prèviament establerta en el laboratori (Figura 12). Una estimació de la dosi requereix, per tant, que l'anàlisi de la mostra problema es realitzi amb els mateixos criteris que els emprats en l'elaboració de la corba dosi-efecte. Per això, cada laboratori de DB ha d'elaborar les seves pròpies corbes de calibració.

Després d'una exposició homogènia a raigs X o raigs γ , la distribució dels cromosomes dicèntrics per cèl·lula s'ajusta a una distribució de Poisson, on la variança és igual a la mitjana. En canvi, per les radiacions d'alta LET s'observa una sobredispersió, essent la variança (σ^2) més gran que la mitjana (μ). Aquesta sobredispersió també s'observa en casos d'exposició no homogènia a radiacions de baixa LET.

Per tal d'avaluar si la distribució de dicèntrics s'ajusta a una distribució de Poisson es fa servir el test U (equació 4), on U és la unitat normalitzada de l'índex de dispersió (σ^2/y) que en la distribució de Poisson és 1. Si els valors de la U estan compresos en l'interval ± 1.96 es considera que la distribució s'ajusta a una Poisson amb un nivell de confiança de $\alpha=0.05$ (Rao 1965; Savage 1996).

$$(4) \quad U = \left(\frac{\sigma^2}{y} - 1 \right) \sqrt{\frac{N-1}{2(1-1/x)}}$$

On N és el número de cèl·lules analitzades i x el número de dicèntrics.

1.3.3. Estimació de la dosi

1.3.3.1. En casos d'exposició homogènia

Per tal d'estimar la dosi, cal resoldre l'equació 2. No obstant, en l'estimació de la dosi existeixen incerteses que es poden expressar com a interval de confiança del 95% i que provenen tant de l'error de mostreig com de l'error de la corba. L'error de mostreig assumeix que la distribució de dicèntrics per cèl·lula s'ajusta a una Poisson (Edwards et al. 1979), mentre que l'error de la corba s'ajusta a una distribució normal.

Per tenir en compte aquests dos errors, la solució més senzilla és la proposada per Merkle (1983). Les dosis D_L i D_U (límit inferior i límit superior respectivament, de l'interval de confiança del 95%) s'obtenen a partir de la intersecció entre Y_L i Y_U (límit inferior i superior de l'interval de confiança de la freqüència de dicèntrics) amb l'interval superior i inferior de la corba (Figura 13).

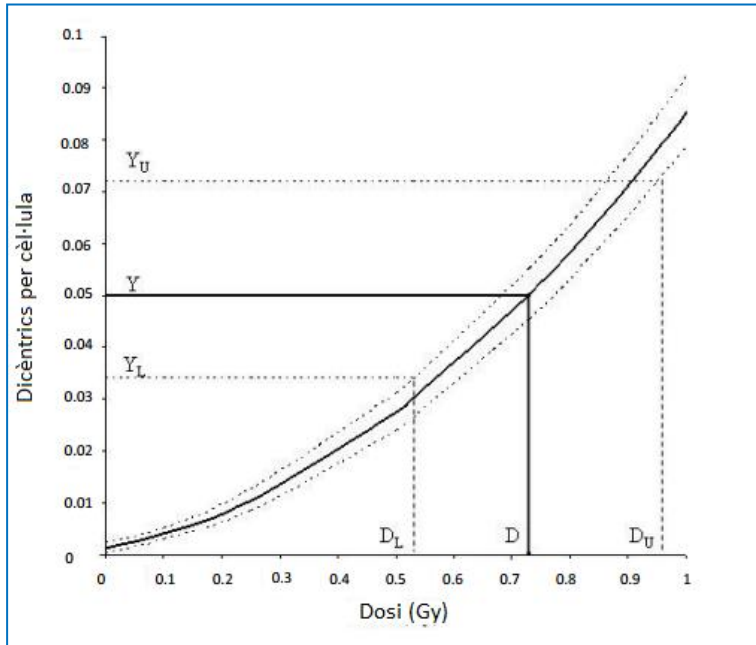


Figura 13. Representació de l'estimació de la dosi (D) i del seu interval de confiança (D_L i D_U). Figura adaptada de IAEA (2011).

1.3.3.2. En casos d'exposició parcial

Hi ha casos on l'exposició només afecta a una part del cos (irradiació parcial) i d'altres en que diferents parts del cos han estat exposades a diferents dosis (irradiació heterogènia). En aquests casos s'observa que la distribució de dicèntrics per cèl·lula es desvia de la Poisson mostrant una sobredispersió (valors de U superiors a 1.96). En aquest sentit, s'han proposat dos mètodes per a estimar la dosi rebuda. El primer mètode es coneix com a mètode de la Poisson contaminada (Dolphin 1969) (equació 5). Aquest mètode considera que les cèl·lules sense dicèntrics provenen de dues poblacions cel·lulars, la població de cèl·lules no irradiades i les cèl·lules sense dicèntrics de la població irradiada. Amb aquest mètode, la freqüència de dicèntrics de la fracció irradiada es determina resolvent per iteració la següent equació:

$$(5) \quad \frac{Y_F}{1 - e^{-y}} = \frac{X}{N - n_0}$$

On Y_F és la freqüència de dicèntrics de la fracció irradiada, e^{-y} representa el número de cèl·lules sense dicèntrics de la fracció irradiada, X és el número total de dicèntrics observats, N el número total de cèl·lules analitzades i n_0 és el número de cèl·lules sense cromosomes dicèntrics.

El segon mètode, proposat per Sasaki i Miyata (1968) i anomenat mètode Qdr, segueix la mateixa aproximació que el mètode de la Poisson contaminada, però a més dels dicèntrics, també té en compte els cromosomes en anell i els fragments acèntrics.

Aquests mètodes permeten calcular la dosi rebuda per la part irradiada en casos d'exposicions parcials, però no permeten un càlcul eficient en casos d'exposicions heterogènies. Recentment s'ha proposat un nou mètode que es basa en la mixtura de Poissons. Aquest mètode permet una acurada estimació de la dosi rebuda per la part o parts irradiades tant en casos d'exposicions parcials com heterogènies (Pujol et al. 2016).

1.3.4. Limitacions de la dosimetria biològica

El recompte de cromosomes dicèntrics per estimar la dosi d'una exposició, és sens dubte el millor mètode per exposicions recents i agudes fins a 5 Gy. No obstant, l'anàlisi de dicèntrics presenta certes limitacions, d'aquí la necessitat d'altres mètodes per ser utilitzats en DB. Entre d'altres, l'anàlisi de translocacions mitjançant tècniques de FISH, el de micronuclis (CBMN), el de foci d'histona γ -H2AX, o l'anàlisi d'AC en cèl·lules en interfase mitjançant la tècnica de condensació prematura de cromosomes (PCC) (Figura 14).

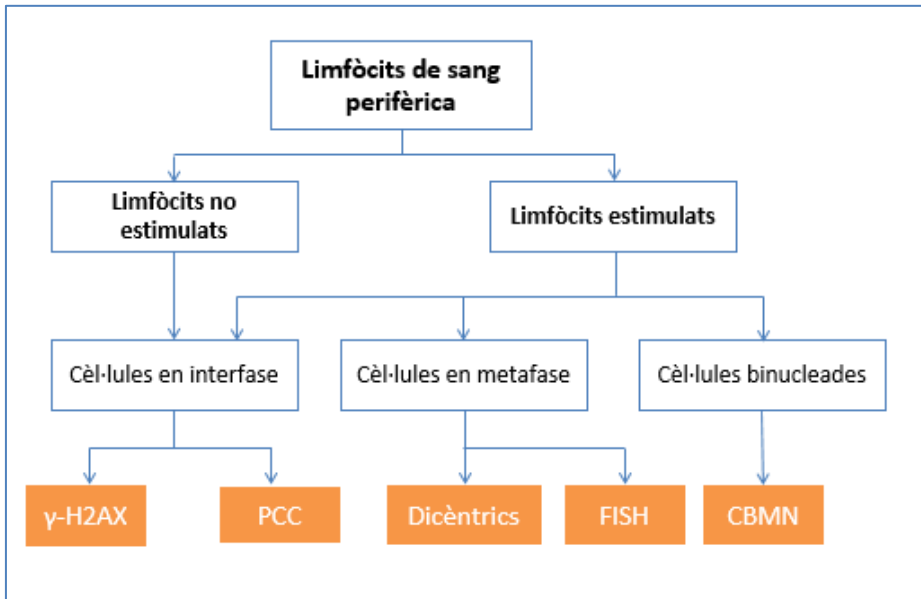


Figura 14. Esquema dels diferents assajos per dosimetria biològica. Modificat de IAEA (2011).

Els cromosomes dicèntrics són mitòticament inestables i les cèl·lules portadores tendeixen a desaparèixer a mesura que passa el temps post-irradiació. Per tant, al estimar la dosi d'una exposició passada a partir del recompte de dicèntrics es tendeix a infravalorar la dosi. En aquests casos, l'anàlisi de les translocacions recíproques és la millor alternativa. Aquestes alteracions s'indueixen a una freqüència similar a la dels cromosomes dicèntrics però al ser mitòticament estables, la seva freqüència es manté relativament constant al llarg del anys (Bauchinger & Schmid 1998; Lindholm et al. 2002). A partir dels anys 90, i gràcies a la introducció de les tècniques de FISH, l'anàlisi de translocacions ha donat lloc a la DB retrospectiva, que permet estimar dosis d'exposicions accidentals anys després de les mateixes (Sevan'kaev et al. 2000; Rodriguez et al. 2009). Les corbes dosi-efecte per translocacions també segueixen el model lineal quadràtic. No obstant, s'ha observat que la freqüència basal de les translocacions és superior a la dels

cromosomes dicèntrics i augmenta amb l'edat (Sigurdson et al. 2008), la qual cosa fa que el límit inferior de detecció de sobreexposició sigui superior al de dicèntrics (IAEA, 2011).

Una altre limitació de l'anàlisi de dicèntrics és el temps requerit per l'anàlisi. Per estimar la dosi d'una mostra problema cal fer el recompte de dicèntrics en 500 cèl·lules amb un mínim de 46 centròmers, i a més s'ha d'avaluar si cada dicèntric va acompanyat del corresponent fragment acèntric, el que pot requerir de dos a quatre dies d'anàlisi al microscopi. Una tècnica que requereix menys temps, és l'anàlisi dels micronuclis (MN) en cèl·lules amb la citocinesi bloquejada (assaig CBMN), que són més fàcilment analitzables (Fenech & Morley 1985, Fenech 2000). Tanmateix la freqüència basal de MN és més variable que la de dicèntrics, 2-36 MN per cada 1.000 cèl·lules (Antunes et al. 2014), i per tant el límit inferior de detecció de dosi és superior. Així mateix s'ha descrit que amb l'assaig de CBMN l'estimació de la dosi no és tant acurada com en l'anàlisi de cromosomes dicèntrics o translocacions (Ainsbury et al. 2011). Les corbes dosi-efecte mitjançant l'assaig CBMN s'ajusten al model lineal quadràtic i en totes elles s'observa una sobredispersió de la distribució de MN per cèl·lula. Això fa que si apliquem l'anàlisi de la distribució de Poisson com a marcador d'homogeneïtat, l'anàlisi de MN no permet distingir entre exposicions homogènies i no homogènies (Antunes et al. 2014; Rastkhah et al. 2015).

Tant l'anàlisi de cromosomes dicèntrics com el de MN requereixen d'un mínim de 48 hores ja que les cèl·lules s'han de cultivar. Aquesta limitació no la presenta l'anàlisi de foci de la histona H2AX fosforilada (γ -H2AX) (Rothkamm & Löbrich 2003). Quan es produeix un trencament de doble cadena en el DNA, en pocs minuts es fosforila la histona H2AX. La fosforilació de la histona es pot detectar per immunofluorescència i es útil per detectar exposicions durant les primeres 24 hores post-irradiació. S'ha descrit que el

INTRODUCCIÓ

número de foci d' γ -H2AX induïts per RI augmenta linealment amb la dosi de radiació i s'ha posicionat com un potencial marcador per a realitzar un triatge ràpid en cas d'accident, sempre i quan es puguin obtenir mostres en les primeres 24 hores (Roch-Lefèvre et al. 2010; Moquet et al. 2014). Passat aquest temps l'anàlisi de foci no és apte per a estimar la dosi, el que compromet seriosament el seu us en la majoria de casos de DB.

Tant l'anàlisi de dicèntrics com el de translocacions, MN o foci presenten una altre limitació. A dosis elevades (superiors a 5-6 Gy) es molt difícil obtenir cèl·lules analitzables i per tant, per exposicions a dosis elevades cal trobar altres biomarcadors. Amb aquest fi, en els darrers anys, s'han desenvolupat dues estratègies principals. La primera és l'ús de cafeïna per permetre que cèl·lules amb molt dany en el DNA progressin de G2 a M, el que permet analitzar dicèntrics a dosis superiors a 6 Gy. La segona és la condensació prematura de cromosomes, PCC, que permet analitzar el dany cromosòmic en cèl·lules interfàsiques.

1.4. Condensació prematura de cromosomes

Com s'ha explicat anteriorment, el cicle cel·lular presenta diferents punts de control que impedeixen que les cèl·lules molt danyades progressin (Niida & Nakanishi 2006). Això provoca que les cèl·lules irradiades mostrin un retard mitòtic i una major dificultat o fins i tot una impossibilitat per arribar a metafase (Wu et al. 2001). Aquesta selecció negativa de les cèl·lules danyades implica que després d'una irradiació a una dosi elevada (>5-6 Gy), el nombre de cèl·lules que arriben a metafase sigui insuficient per a una estimació acurada de la dosi (Waselenko et al. 2004).

Aquesta limitació ha conduit a la recerca de noves tècniques que condensin prematurament el material genètic, permetent analitzar el dany cromosòmic

en cèl·lules en interfase, sense la necessitat de que arribin a metafase. Les tècniques de PCC condensen els cromosomes de les cèl·lules en interfase i són una eina prometedora per l'estimació acurada en casos d'exposicions a dosis elevades de RI. Aquesta metodologia també permet profunditzar en el coneixement sobre els mecanismes de producció de dany genètic i la resposta cel·lular.

Existeixen dues estratègies per induir la PCC. Per una banda, la fusió cel·lular (Rao & Johnson 1970), que consisteix en induir la fusió de limfòcits de sang perifèrica amb cèl·lules mitòtiques d'ovari de hámster xinès (CHO) (Pantelias & Maillie 1983). L'aplicació d'aquesta estratègia a la DB, proposa l'anàlisi de peces cromosòmiques extra, cromosomes dicèntrics i cromosomes en anell, depenent de la tècnica de tinció utilitzada (Pantelias & Maillie 1983; Darroudi et al. 1998; Karachristou et al. 2015).

Per altre banda, es pot induir químicament la condensació de la cromatina utilitzant reactius com la caliculina-A o l'àcid ocadaic (Gotoh & Asakawa 1996; Prasanna et al. 2000; Gotoh & Durante 2006) (Figura 15). La condensació química de cromosomes és tècnicament més fàcil i permet obtenir un major número de cèl·lules analitzables en comparació amb la condensació per fusió cel·lular. Cal indicar però, que la condensació química requereix del cultiu dels limfòcits, mentre que la condensació per fusió es pot fer en limfòcits no estimulats.

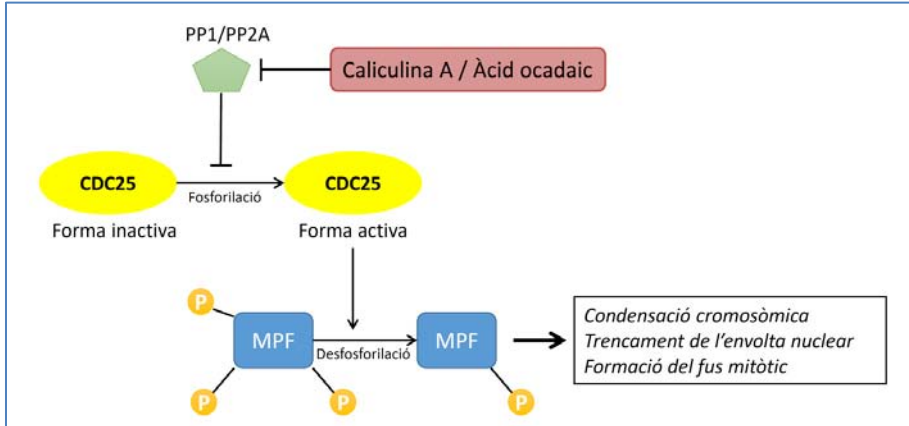


Figura 15. Esquema del mode d'acció de la caliculina-A o l'àcid ocaidaic. La caliculina-A i l'àcid ocaidaic són inhibidors específics de les proteïnes serina/treonina fosfatases tipus 1 i tipus 2A (PP1 i PP2A) que provoquen l'activació de la proteïna CDC25. El complex ciclina B/CDC2, conegut com a factor promotor de la mitosis (MPF) és una proteïna cinasa que promou esdeveniments mitòtics com la condensació dels cromosomes. L'activació del MPF és degut a una desfosforilació mediada per la forma activa de la CDC25. L'àcid ocaidaic o la caliculina-A inhibeixen les proteïnes PP1 i PP2A donant com a resultat l'activació de la CDC25 i aquesta l'activació del MPF que promou la condensació prematura dels cromosomes. Adaptat de Gotoh & Durante (2006).

Els cromosomes prematurament condensats presenten unes característiques diferents segons la fase del cicle cel·lular en la que es produeix la condensació. En cèl·lules en G1, els cromosomes presenten una sola cromàtide, mentre que durant la replicació, a la fase S, s'observa una cromatina difosa. De les cèl·lules interfàsiques, les que es troben en G2 són les que mostren cromosomes amb una morfologia més adequada per a l'anàlisi citogenètica. Els cromosomes prematurament condensats en G2 són similars als cromosomes metafàsics però no mostren la constricció centromèrica. Per tant, la quantificació del dany mitjançant PCC no es pot basar en l'anàlisi de cromosomes dicèntrics. Per aquesta raó, s'ha proposat l'anàlisi de diversos biomarcadors com són els cromosomes en anell (PCC-R) (Gotoh & Asakawa 1996), les peces cromosòmiques extra (Balakrishnan et al. 2010), l'ús combinat del número de peces cromosòmiques i l'índex de

cèl·lules en G2 (Durante et al. 1998), la ràtio entre la peça cromosòmica més llarga i la més curta (Gotoh & Tanno 2005), i també l'anàlisi de les AC tipus intercanvi mitjançant tècniques de FISH (Prasanna et al. 2000).

Els estudis utilitzant la tècnica de PCC, s'han mostrat útils per poder quantificar l'efecte de les RI després de dosis d'exposició de fins a 20-30 Gy (Gotoh & Durante 2006). En pacients sotmesos a radioteràpia, la tècnica PCC combinada amb tècniques de FISH a mostrat una bona correlació entre la freqüència d'AC i el volum del cos irradiat (Lee et al. 2011). Pel que fa a l'establiment de corbes dosi-efecte, l'anàlisi de la freqüència de cromosomes en anell s'ha pogut realitzar fins a dosis de 20 Gy de radiacions de baixa LET, indicant la seva idoneïtat per a estimar la dosi rebuda en exposicions a més de 5 Gy (Kanda et al. 1999).

Cal destacar que les corbes dosi-efecte amb PCC publicades fins ara han estat realitzades amb molt pocs punts de dosis (4-5) i mostren discrepàncies en els coeficients α obtinguts (Lamadrid et al. 2007, 2011; Lindholm et al. 2009; Balakrishnan et al. 2010; Romero et al. 2013). Aquestes discrepàncies indiquen que per validar la PCC per a la seva utilització en DB, es requereix de l'establiment de corbes dosi-efecte amb un mínim de 10 punts de dosi, tal i com recomana la IAEA (IAEA 2011).

Malgrat les limitacions descrites de les corbes publicades fins ara, la PCC s'ha utilitzat amb èxit per estimar dosis d'exposició en casos d'accidents, com és el cas de l'accident de Tokai-mura. Al setembre de 1999, tres treballadors es van veure severament exposats a neutrons i raigs γ . El baix nombre de limfòcits presents en la sang, indicava que la dosi d'exposició total a la que havien estat exposats era molt alta. Mitjançant l'anàlisi de cromosomes en anell es va poder estimar la dosi rebuda 53 hores després de la recollida de la primera mostra de sang (62 hores després de l'exposició). Les dosis

INTRODUCCIÓ

estimades en els tres individus van ser de >20 Gy, 7.4 (6.5-8.2) Gy i 2.3 (1.8-2.8) Gy (Hayata et al. 2001).

2. OBJECTIUS

L'objectiu d'aquesta tesi doctoral, és avaluar la utilitat de la tècnica de condensació prematura de cromosomes per al seu ús en dosimetria biològica per dosis altes de raigs γ i partícules α .

L'objectiu general es concreta en els objectius següents:

1. Avaluar les diferents morfologies cromosòmiques que s'observen mitjançant la tècnica de PCC i analitzar la seva proporció en relació a la dosi.
2. Determinar els tipus d'alteracions cromosòmiques detectables i analitzar la seva relació amb la dosi.
3. Elaborar les corbes dosi-efecte pels diferents tipus d'alteracions cromosòmiques.
4. Per a raigs γ , validar la tècnica de PCC simulant casos d'irradiació parcial.
5. Determinar quin seria el biomarcador més adient per a realitzar estudis de dosimetria biològica amb PCC.

3. RESULTATS

TREBALL 1

Puig R., Barrios L., Pujol M., Caballín M. R. & Barquinero J. F. (2013). **Suitability of scoring PCC rings and fragments for dose assessment after high-dose exposures to ionizing radiation.** *Mutation Research*, 757(1):1-7.

TREBALL 2

Puig R., Pujol M., Barrios L., Caballín M. R. & Barquinero J.F. (2016). **Analysis of α -particle-induced chromosomal aberrations by chemically-induced PCC. Elaboration of dose-effect curves.** *International Journal of Radiation Biology*, 92(9), 493-501.

4. DISCUSSIÓ

En el cas que un individu s'exposi a una dosi elevada de RI, l'estimació acurada de la dosi rebuda és molt important per predir els possibles efectes clínics, i pot ajudar a establir el tractament més adequat. Després d'una exposició a una dosi elevada de RI, apareixen una sèrie de símptomes que s'engloben dins l'anomenada síndrome d'irradiació aguda. La manifestació clínica d'aquesta síndrome pot incloure alteracions cutànies, com eritemes; hematopoètiques, com anèmia aplàstica; gastrointestinals, com nàusees i vòmits; i en alguns casos, cerebrovasculars, com pot ser el mareig i fins i tot la pèrdua de consciència. El tractament variarà segons els símptomes que es presentin, la dosi rebuda i l'escenari de l'exposició. Si la persona exposada presenta afectació hematopoètica, el tractament a curt termini amb antibiòtics i citocines és apropiat quan la dosi d'exposició és inferior a 3 Gy (Anno et al. 2003). Una teràpia prolongada amb citocines, amb transfusió de sang i fins i tot amb transplantament de cèl·lules mare és el tractament que es proposa quan la dosi d'exposició és més alta (> 7 Gy) (Waselenko et al. 2011).

En el cas d'un escenari amb un nombre elevat de persones possiblement exposades a RI, és essencial una resposta ràpida dels laboratoris especialitzats en DB, però les capacitats d'un sol laboratori poden quedar limitades. Actualment, laboratoris de DB de diversos països estan establint xarxes de suport mutu per coordinar-se i per donar una resposta ràpida i organitzada en aquestes possibles situacions. L'estimació de l'exposició a RI mitjançant el recompte de cromosomes dicèntrics és el mètode majoritari en els laboratoris de DB, i també el que està més àmpliament harmonitzat (Romm et al. 2013, 2014, 2016; Oestreicher et al. 2016). Tot i així, quan les dosi d'exposició són molt elevades (>5 Gy), l'anàlisi de dicèntrics pot esdevenir poc útil. Una de les poques metodologies amb possibilitats reals d'utilització en aquests casos és la PCC. No obstant, a dia d'avui, s'han

publicat poques corbes dosi-efecte amb PCC, i aquestes presenten variabilitat en els criteris d'anàlisi així com en la metodologia. Entre les corbes publicades n'hi ha tant per radiacions de baixa LET (Lamadrid et al. 2007; Lindholm et al. 2009; Balakrishnan et al. 2010) com per radiacions d'alta LET (Lamadrid et al. 2007, 2011; Wang et al. 2007; Lee et al. 2011).

4.1. Cèl·lules amb diferents tipus de morfologies cromosòmiques observades amb la tècnica de PCC

Amb la tècnica utilitzada en la present tesi per induir la PCC (caliculina-A combinada amb colcemid), es van observar cèl·lules amb tres tipus de morfologies cromosòmiques, G2/M-PCC, M i M/A-PCC, atribuïbles a diferents moments del cicle cel·lular. Es van classificar com a cèl·lules en metafase (M) aquelles en les que tots els cromosomes presentaven les dues cromàtides alineades i la constricció centromèrica. Les cèl·lules en les que els cromosomes presentaven les dues cromàtides alineades però sense la constricció centromèrica es van classificar com a G2/M-PCC, i es considera que es troben en la fase G2 del cicle cel·lular. Aquesta nomenclatura deriva de la descrita per Rao & Johnson (1970), que van realitzar la tècnica de PCC mitjançant fusió cel·lular i observaven cèl·lules heterofàsiques induïdes per la fusió de cèl·lules en interfase i cèl·lules en mitosis (G2/M-PCC), i és la nomenclatura que utilitza la majoria d'autors que apliquen la tècnica de PCC induïda químicament. Per últim, aquelles cèl·lules en les que els cromosomes mostraven les dues cromàtides separades o desalineades es van descriure com a M/A-PCC d'acord amb el descrit per Kanda et al. (1999). Per a aquesta morfologia cel·lular existeix certa confusió tant per la nomenclatura com pel moment del cicle cel·lular que se li atribueix; alguns autors han suggerit que són cèl·lules en fase M tardana (Lamadrid et al. 2007), i altres cèl·lules en anafase (Romero et al. 2013; IAEA 2011).

Els dos treballs inclosos en aquesta tesi, són els primers que analitzen la variació de la proporció de cèl·lules amb les diferents morfologies cromosòmiques en relació a la dosi. En limfòcits no irradiats, aplicant la tècnica de PCC combinada amb colcemid, la majoria de les cèl·lules es trobaven en fase M. Independentment del tipus de radiació, raigs γ o partícules α . De manera general, a mesura que augmentava la dosi d'exposició, es va observar una clara reducció de les cèl·lules en M i un augment de les cèl·lules en G2/M-PCC (Figura 16). Després de la irradiació amb raigs γ , la proporció de cèl·lules en M que a 0 Gy representaven el 47%, va disminuir fins al 3.4% a 3 Gy. Després de l'exposició amb partícules α , tal i com era d'esperar, la reducció de les cèl·lules capaces d'arribar a metafase va ser més acusada, doncs la seva proporció va disminuir del 87% a 0 Gy al 0.6% a 2.5 Gy. Lücke-Hugle et al. (1983) i Ritter et al. (2002) ja havien descrit una major eficàcia de les partícules α , respecte les radiacions de baixa LET, en reduir l'índex mitòtic. La reducció de l'índex mitòtic s'ha relacionat amb la presència d'alteracions complexes (Testard et al. 1997; George et al. 2001) i s'ha descrit que la proporció de cèl·lules altament danyades i amb AC complexes és major quan aquestes s'exposen a radiacions d'alta LET (George et al. 2003). Les AC complexes, tot i que també s'indueixen a partir de dosis de 2-3 Gy de RI de baixa LET (Barquinero et al. 1999; Rodríguez et al. 2009), s'han descrit com a alteracions característiques d'irradiacions amb partícules α (Griffin et al. 1995; Anderson et al. 2000). Després de l'exposició a partícules α , les AC complexes apareixen a dosis baixes i la seva proporció és relativament constant amb la dosi (Barquinero et al. 2004; Mestres et al. 2004). És per això que s'ha proposat a les insercions, un tipus d'AC que no causa problemes durant la segregació cromosòmica en la mitosis, com un biomarcador d'exposicions passades a partícules α (Anderson et al. 2000).

DISCUSSIÓ

La cèl·lules M/A-PCC només es van observar en l'estudi realitzat amb raigs γ , i la seva freqüència es va mostrar relativament constant al llarg de totes les dosis, amb una mitjana de 0.23 ± 0.04 (Figura 16). Kanda et al. (2004), utilitzant àcid ocaidaic per induir la PCC, també van descriure que la proporció de cèl·lules M/A-PCC era constant a les dosis analitzades (5, 10 i 20 Gy de raigs X), essent d'unes tres vegades superior a la observada en el treball 1.

La proporció relativament constant de cèl·lules M/A-PCC a totes les dosis de raigs γ , i la seva absència en l'estudi amb partícules α , suggereix que la seva presència podria ser deguda a la metodologia emprada per a l'obtenció de cromosomes en interfase. En l'estudi amb raigs γ , es va irradiar sang total i posteriorment els limfòcits es van cultivar en suspensió. En canvi, en l'estudi amb partícules α , primer es van aïllar i estimular els limfòcits per tal d'aconseguir la seva adhesió a una làmina de politereftalat d'etilè (Mylar) i posteriorment es van irradiar i cultivar.

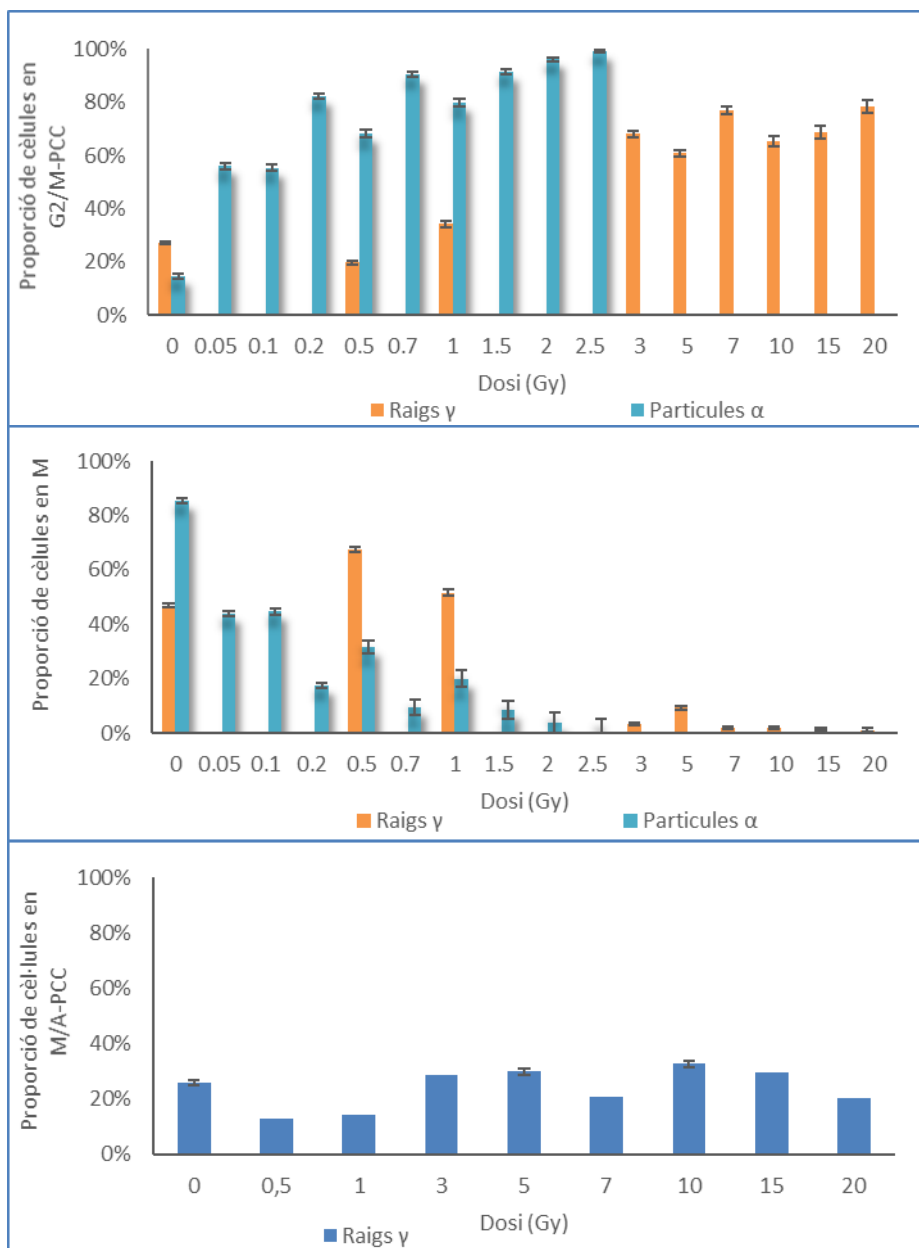


Figura 16. Proporció de cèl·lules G2/M (a dalt) i cèl·lules en M (al mig) per a radiació amb raigs γ i radiació amb partícules α . Proporció de cèl·lules M/A-PCC (a baix) per raigs γ .

4.2. Freqüència d'alteracions cromosòmiques en les cèl·lules amb diferents morfologies

La tècnica de PCC amb caliculina-A i colcemid i utilitzant tinció uniforme, permet detectar tres tipus d'AC. Els cromosomes en anell, que es poden observar en els tres tipus de morfologies cromosòmiques, els fragments cromosòmics extra, que són fàcilment analitzables en les cèl·lules en M i G2/M-PCC, i els cromosomes dicèntrics, que són observables en M. Els fragments cromosòmics extra també podrien ser valorats en les cèl·lules M/A-PCC, però s'haurien de comptar els que excedeixen de les 92 peces cromosòmiques (Balakrishnan et al. 2010), requerint pel seu anàlisi una alta inversió de temps, el que limita la seva utilitat en DB.

4.2.1. Cromosomes en anell

Tant amb raigs γ com amb partícules α , la freqüència de cromosomes en anell va incrementar amb la dosi d'irradiació (Figura 17). Amb raigs γ i utilitzant la mateixa tècnica per induir la PCC que en la present tesi, Lamadrid et al. (2007) van observar unes freqüències de cromosomes en anell en el total de cèl·lules molt similars a les observades en el treball 1. Aquests mateixos autors, irradiant amb neutrons de 0.49 MeV van observar una saturació de la freqüència dels cromosomes en anell a partir de 4.9 Gy (Lamadrid et al. 2011).

En el nostre estudi, irradiant amb partícules α aquesta saturació no s'ha observat, probablement degut a que la dosi màxima d'exposició a partícules α va ser de 2.5 Gy. Aquest fenomen de saturació tampoc s'ha detectat en el treball 1 irradiant fins a la dosi de 20 Gy, ni en cap treball realitzat amb raigs γ (Lamadrid et al. 2007; Lindholm et al. 2009; Balakrishnan et al. 2010; Romero et al. 2013).

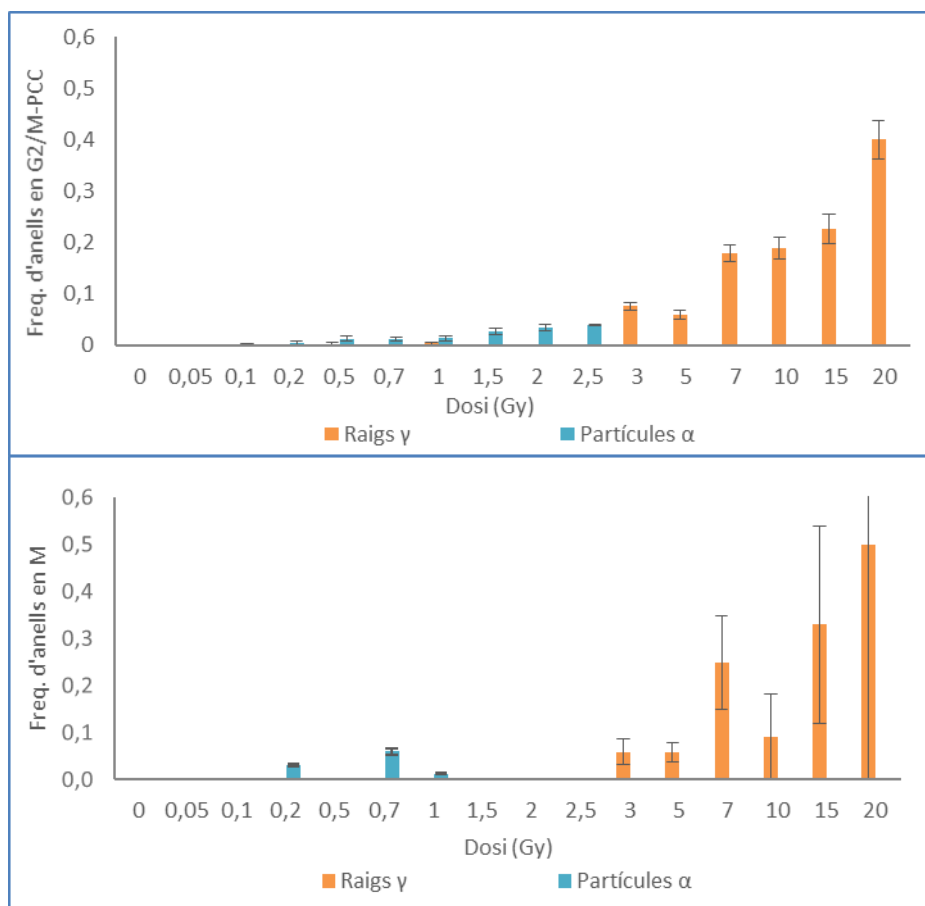


Figura 17. Frequència de cromosomes en anell en les cèl·lules G2/M (a dalt) i en les cèl·lules en M (a baix) per a radiació amb raigs γ i radiació amb partícules α .

La freqüència de cromosomes en anell observada en el treball 1 va ser molt superior en les cèl·lules M/A-PCC que en les G2/M-PCC, resultat no esperat si es considera que les cèl·lules M/A-PCC es troben en metafase tardana o anafase. Aquest fet suggereix que les cèl·lules anomenades M/A-PCC podrien estar en realitat en un estadi del cicle cel·lular anterior a la mitosi i no posterior com s'havia postulat (Lamadrid et al. 2007; Romero et al. 2013). En el supòsit que fossin cèl·lules en un estadi posterior a M, esperaríem una freqüència similar de cromosomes en anell a l'observada en les cèl·lules en

DISCUSSIÓ

M. Kanda et al. (2004) no van observar diferències significatives en la freqüència de cromosomes en anell entre les cèl·lules G2/M-PCC i les M/A-PCC, i aquesta freqüència a més és similar a la de les cèl·lules M/A-PCC del treball 1 de la present tesi. Cal indicar que Kanda et al. (2004), emprant àcid ocaidaic per la inducció de la PCC, van observar que la proporció de cèl·lules M/A-PCC era del 70% i la de cèl·lules G2/M-PCC era del 30%, proporcions inverses a les observades en el treball 1 de la present tesi. Aquest fet reforça la idea que la metodologia emprada per la inducció de la PCC podria influir en la proporció de les diferents morfologies cel·lulars observades, i per tant en la freqüència de les AC.

El fet que la freqüència observada de cromosomes en anell en cèl·lules M/A-PCC hagi estat superior a la observada en les cèl·lules G2/M-PCC, indicaria que aquestes cèl·lules es troben en la fase G2 del cicle cel·lular, però amb les cromàtides desalineades. La major freqüència de cromosomes en anell podria ser deguda a la major facilitat de detecció d'aquests en cromosomes amb una sola cromàtide, sobretot quan els anells són molt petits. Si fos així, aquestes cèl·lules no haurien superat el punt de control de G2 a M, i proposem referir-se a elles com a cèl·lules G2 desalineades o G2/D-PCC, i a les cèl·lules en G2 com a G2-PCC.

Pel que fa a la freqüència de cromosomes en anell en les cèl·lules en M, i per ambos tipus de radiació, el baix nombre de cèl·lules observades a altes dosis i el baix nombre de cromosomes en anell observats, impedeix avaluar correctament la seva freqüència, sobretot en el treball 1, on l'error de la freqüència és molt gran. En el treball 2, realitzat amb partícules α , a partir de 1 Gy no es van observar cromosomes en anell (figura 17). Després de l'exposició de limfòcits de sang perifèrica a partícules α , Schmid et al. (1996) amb tinció uniforme i Barquinero et al. (2004) utilitzant tècniques de FISH també van observar una freqüència baixa de cromosomes en anell.

4.2.2. Fragments cromosòmics extra

A totes les dosis i per ambdós tipus de radiacions, la freqüència de fragments cromosòmics extra en cèl·lules G2/M-PCC va ser superior a la de les cèl·lules en M (Figura 18). Això podria ser degut a la selecció negativa en el punt de control de G2/M de les cèl·lules portadores d'AC incomplertes (Rodríguez et al. 2009). Gotoh & Tanno (2005) utilitzant també la tècnica de PCC en limfòcits irradiats a dosis altes de raigs γ , van descriure freqüències de fragments cromosòmics extra en les cèl·lules en G2/M-PCC similars a les observades en el present estudi amb raigs γ .

Per ambdós tipus de radiacions, la freqüència de fragments cromosòmics extra, tant en cèl·lules G2/M-PCC com en cèl·lules M, va ser molt superior a la freqüència de cromosomes en anell, i també va mostrar una clara relació dosi-efecte. La diferència entre les freqüències de fragments cromosòmics extra i de cromosomes en anell va ser més acusada per partícules α que per raigs γ . Irradiant amb raigs γ , s'ha descrit que la freqüència de fragments cromosòmics extra en el total de cèl·lules és unes 10 vegades superior a la freqüència de cromosomes en anell (Balakrishnan et al. 2010).

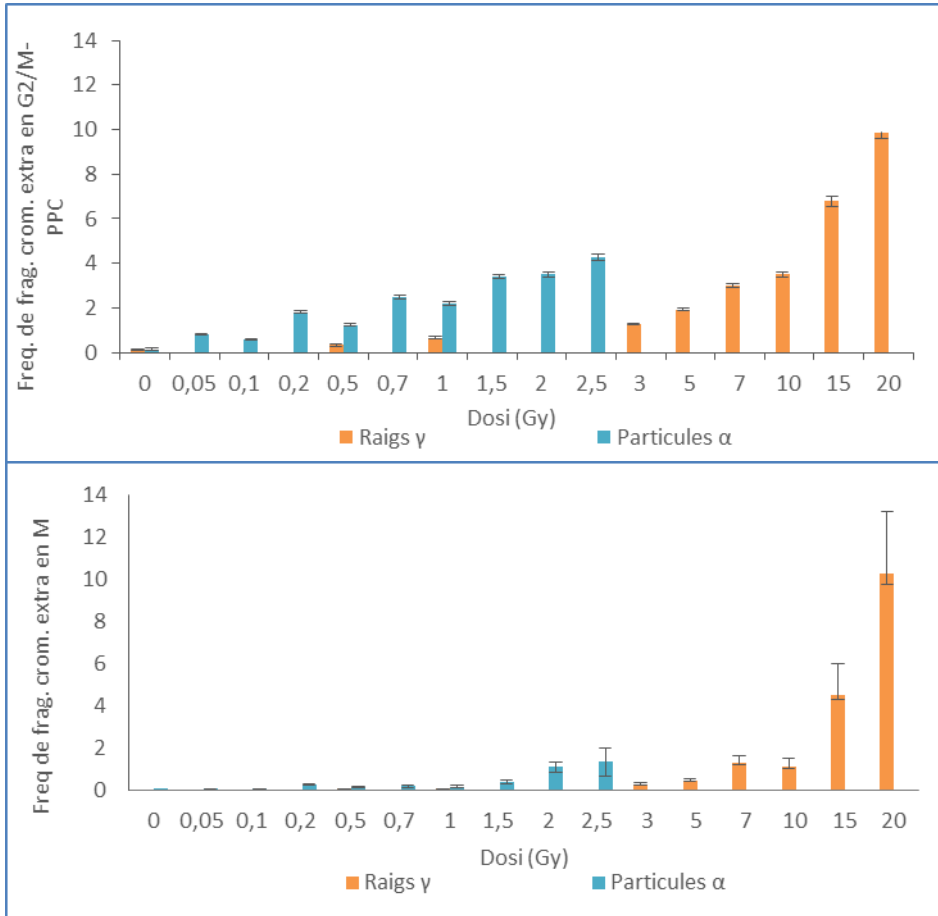


Figura 18. Freqüència de fragments cromosòmics extra en cèl·lules G2/M (a dalt) i en cèl·lules en M (a baix) per a radiació amb raigs γ i radiació amb partícules α .

Cromosomes dicèntrics

En l'estudi amb raigs γ , la freqüència de dicèntrics va mostrar un màxim a la dosi de 15 Gy (Figura 19). Fenòmens de saturació de la freqüència dels cromosomes dicèntrics a altes dosis de RI ja han estat descrits anteriorment (Hayata et al. 2001; Sasaki 2003; Wojcik 2004; Yao et al. 2010; Vinnikov et al. 2013; Pujol et al. 2014). Aquesta limitació en la formació de cromosomes dicèntrics a altes dosis, s'explica pel nombre de centròmers disponible en les cèl·lules (Norman & Sasaki 1966).

En el treball 2, la freqüència de dicèntrics a les dosis de fins a 1 Gy (Figura 19) va ser similar a les descrites anteriorment utilitzant la mateixa font i metodologia d'irradiació, però amb la tècnica de cultiu convencional (Schmid et al. 1996; Barquinero et al. 2004; Schmid & Roos 2009).

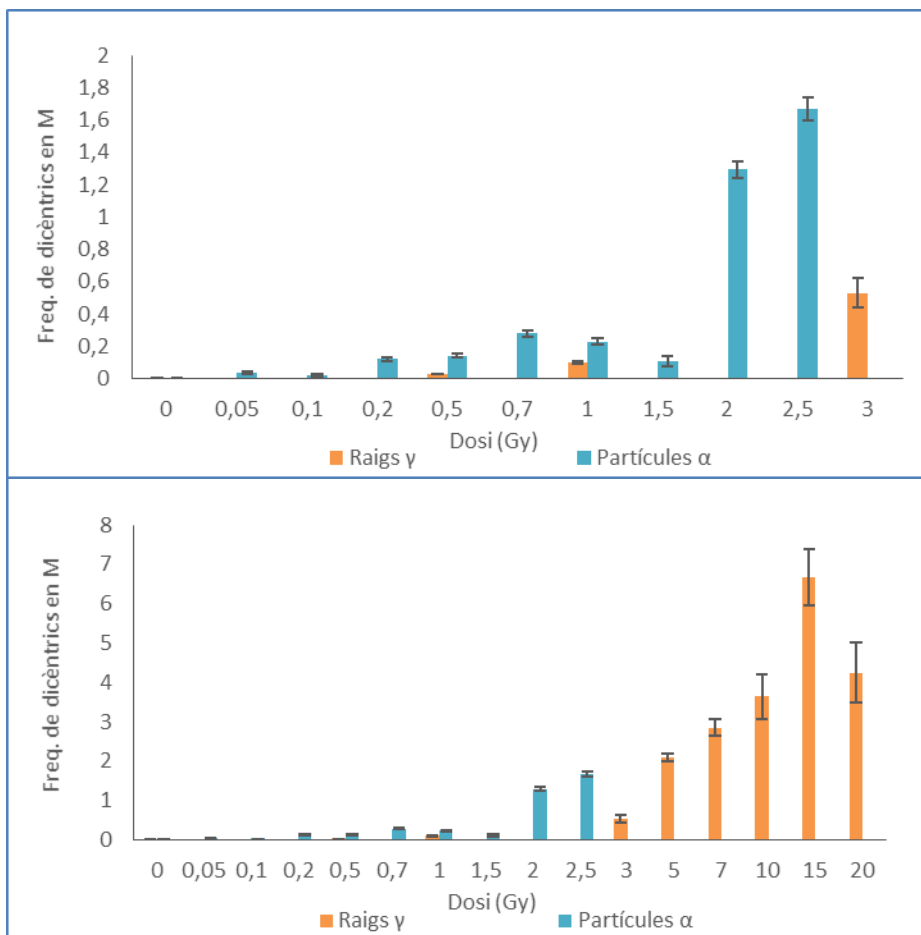


Figura 19. Freqüència de cromosomes dicèntrics presents en cèl·lules en M per ambdós tipus de radiació. A dalt de 0 a 3 Gy, i a baix de 0 a 20 Gy.

4.3. Corbes dosi-efecte per les diferents alteracions cromosòmiques

4.3.1. Cromosomes en anell

Per a raigs γ , es van establir corbes dosi-efecte per als cromosomes en anell en cèl·lules en G2/M-PCC, en M/A-PCC i en el total de cèl·lules. Els coeficients α obtinguts per les corbes en cèl·lules G2/M-PCC i pel total de cèl·lules no van mostrar diferències significatives, però ambdós van ser significativament inferiors al coeficient de la corba obtingut en cèl·lules en M/A-PCC (Taula 2).

Per radiacions de baixa LET i utilitzant la PCC, a data d'avui, s'han publicat quatre corbes dosi-efecte de cromosomes en anell en el total de cèl·lules, dues amb àcid ocadaic (Balakrishnan et al. 2010; Lindholm et al. 2009) i dues combinant caliculina-A i colcemid (Lamadrid et al. 2007; Romero et al. 2013). A la taula 2 es poden observar els coeficients lineals d'aquestes corbes i els del nostre treball.

El valor del coeficient α obtingut per Lamadrid et al. (2007) utilitzant caliculina-A i colcemid és bastant similar a l'observat en el treball 1. Els coeficients α de les corbes dosi-efecte obtingudes amb àcid ocadaic també van similars entre ells, però unes dues vegades majors que els obtinguts utilitzant caliculina-A i colcemid. Romero et al. (2013) però, emprant la mateixa metodologia que Lamadrid et al. (2007), van obtenir un coeficient α més pròxim als obtinguts emprant àcid ocadaic.

Autors	Tipus, font i taxa de dosi	Dosis (Gy)	Tècnica de PCC	Morfologia cel·lular	Coefficient $\alpha \pm SE \cdot Gy^{-1}$
Radiació de baixa LET					
Lamadrid et al. 2007	Raigs γ , Co^{60} (0.5 Gy/min)	5, 7.5, 10, 20, 25	Caliculina-A + colcemid	Cèl·lules totals	0.021 \pm 0.01
Lindholm et al. 2009	Raigs γ , Co^{60} (0.3Gy/min)	1, 2.5, 5, 10, 15, 20	Àcid ocadaic	Cèl·lules totals	0.049 \pm 0.01
Balakrishnan et al. 2010	Raigs γ , Co^{60} (1.34 γ /min)	6.2, 12.5, 18.4, 24.5	Àcid ocadaic	Cèl·lules totals	0.054 \pm 0.01
Romero et al. 2013	Raigs γ , Co^{60} (0.5 Gy/min)	1, 5, 7.5, 10, 15, 20	Caliculina-A + colcemid	Cèl·lules totals	0.044 \pm 0.001
Trellal 1, Puig et al. (2013)	Raigs γ , Cs^{137} (5.37Gy/min)	0.5, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20	Caliculina-A + colcemid	Cèl·lules totals	0.027 \pm 0.01
				G2/M-PCC	0.019 \pm 0.002
				M/A-PCC	0.053 \pm 0.002
Radiació d'alta LET					
Lamadrid et al. 2007	Neutrons, 0.49MeV	0, 5.4, 5.6, 9.4, 12.7, 26.1	Caliculina-A + colcemid	Cèl·lules totals	0.042 \pm 0.001
Lamadrid et al. 2011	Neutrons, 0.49MeV	0, 1, 1.7, 3.8, 5.4, 5.6, 6, 9.4, 12.7, 26.1	Caliculina-A + colcemid	Cèl·lules totals	0.059 \pm 0.02
Trellal 2, Puig et al. 2016	Partícules α , 2.7MeV (0.1Gy/min)	0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 1, 1.5, 2, 2.5.	Caliculina-A + colcemid	G2/M-PCC	0.017 \pm 0.02
				Cèl·lules totals	0.017 \pm 0.02

Taula 2. Per radiacions de baixa i alta LET, coeficients α obtinguts en les diferents corbes dosi-efecte per a cromosomes en anell.

Les diferències entre els coeficients lineals observats en les diferents corbes dosi-efecte es podrien explicar per les diferències en la proporció de les diferents morfologies cel·lulars. En les cèl·lules exposades a raigs γ , el coeficient lineal obtingut per les corbes de les cèl·lules en M/A-PCC va ser similar al dels obtinguts en els estudis amb àcid ocadaic (Balakrishnan et al. 2010; Lindholm et al. 2009). Com ja s'ha esmentat, utilitzant àcid ocadaic la proporció de cèl·lules en M/A-PCC és tres vegades major que la proporció de cèl·lules en G2/M-PCC (Kanda et al. 2004), i les cèl·lules M/A-PCC presenten una freqüència de cromosomes en anell més elevada, així doncs, és raonable que el coeficient α pel total de cèl·lules sigui superior quan la PCC s'indueix amb l'àcid ocadaic. Tot i així, Romero et al. (2013) indiquen que a més del

DISCUSSIÓ

protocol utilitzat, la taxa de dosi i el criteri de validació dels anells podrien explicar les diferències en els coeficients α . Un altre factor que pot influir en les diferències entre els factors α , seria el rang de dosis utilitzades en cada estudi.

Pel que fa a l'exposició amb partícules α , el coeficient lineal obtingut pels cromosomes en anell (tant per cèl·lules en G2/M-PCC i com pel total de cèl·lules) és inferior al descrit per Lamadrid et al. (2007, 2011) irradiant amb neutrons i emprant la mateixa metodologia que en els nostres treballs. Una possible explicació seria que les partícules α són menys eficients que els neutrons amb una energia de 0.49 MeV alhora d'induir cromosomes en anell (Taula 2), tot i que segons la ICRP-103 (2007) ambdós tindrien un factor de ponderació (w_R) similar.

Si es comparen els coeficients α de les corbes de cromosomes en anell obtinguts per partícules α en les cèl·lules en G2/M-PCC i pel total de cèl·lules, es pot observar que són similars als obtinguts per les cèl·lules en G2/M-PCC irradiades amb raigs γ i clarament inferiors a l'obtingut pel total de cèl·lules (Taula 2). Tenint en compte que el factor α fa referència a aquelles AC produïdes per una única trajectòria de RI, és difícil d'explicar que el coeficient lineal obtingut per partícules α sigui inferior a l'obtingut per raigs γ . L'absència de cèl·lules en M/A-PCC en els cultius irradiats a alta LET podria explicar-ho. En les cèl·lules amb aquesta morfologia, els cromosomes en anell són més fàcilment observables, i quan són de mida petita es distingeixen més fàcilment dels fragments cromosòmics extra, el que permet obtenir recomptes superiors. En canvi, la baixa freqüència de cromosomes en anell observats a les cèl·lules exposades a partícules α , podria explicar-se per les condicions d'irradiació i pels patrons de ionització. Per la irradiació amb partícules α , els limfòcits van ser exposats formant una monocapa de cèl·lules adherides a una làmina Mylar. S'ha descrit que la morfologia del

nucli en aquestes condicions és més aplanada en comparació a la dels limfòcits en suspensió que mantenen un nucli amb forma esfèrica (Schmid et al. 2011). De fet, utilitzant el mateix dispositiu i metodologia per irradiar limfòcits, Schmid et al. (2011) van descriure que la F-ràtio (ràtio entre els cromosomes dicèntrics i cromosomes en anell) era clarament inferior en cèl·lules irradiades en suspensió que en les irradiades adherides, indicant una menor inducció de cromosomes en anell quan les cèl·lules s'irradien adherides.

Per tot el que s'ha exposat, per utilitzar la PCC de manera regular i fiable per estimar la dosi rebuda en casos d'exposicions accidentals a altes dosis, els laboratoris de dosimetria biològica haurien d'establir un protocol harmonitzat per a l'establiment de corbes dosi-efecte per a cromosomes en anell mitjançant la tècnica de PCC.

4.3.2. Fragments cromosòmics extra

Els coeficients de les relacions dosi-efecte per a fragments cromosòmics extra en el cas dels raigs γ , es poden veure a la taula 3.

Autors	Tipus, font i taxa de dosi	Dosis (Gy)	Tècnica de PCC	Morfologia cel·lular	Coefficient $\alpha \pm SE \cdot Gy^{-1}$
Radiació de baixa LET					
Balakrishnan et al. 2010	Raigs γ , Co^{60} (1.34 μ /min)	6.2, 12.5, 18.4, 24.5	Àcid ocaidaic	Cèl·lules totals	0.45 \pm 0.04
Treball 1, Puig et al. 2013	Raigs γ , Cs^{137} (5.37Gy/min)	0.5, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20	Caliculina-A + colcemid	Cèl·lules totals	0.39 \pm 0.029
				G2/M-PCC	0.41 \pm 0.022
				M	0.075 \pm 0.014
Radiació d'alta LET					
Treball 2, Puig et al. 2015	Partícules α , 2.7 MeV (0.1Gy/min)	0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 1, 1.5, 2, 2.5	Caliculina-A + colcemid	Cèl·lules totals	1.8 \pm 0.021
				G2/M-PCC	1.53 \pm 0.025
				M	0.30 \pm 0.022

Taula 3. Per radiacions de baixa i alta LET, coeficients α obtinguts en les diferents corbes dosi-efecte per a fragments cromosòmics extra.

DISCUSSIÓ

Per als raigs γ , el coeficient α obtingut en les cèl·lules G2/M-PCC va ser unes 6 vegades superior a l'obtingut a les cèl·lules en M, i molt similar al de Balakrishnan et al. (2010). Cal dir que la corba realitzada per Balakrishnan et al. (2010) inclou les cèl·lules en M/A-PCC. La similitud del coeficient α en ambdues corbes, reforça la idea de que les cèl·lules en M/A-PCC correspondrien a la fase G2 del cicle cel·lular.

Tot i que no tenim coneixement d'altres corbes dosi-efecte per fragments cromosòmics extra utilitzant tècniques de PCC per radiacions de baixa LET, a la literatura es descriu una freqüència superior de fragments cromosòmics extra en les cèl·lules en interfase en comparació a la de les cèl·lules en fase M (Kovacs et al. 1994; Rodríguez et al. 2009), així com també una disminució dels fragments sense telòmers en un dels dos extrems en les cèl·lules en metafase comparades amb les cèl·lules en interfase (Rodríguez et al. 2009).

Pel que fa a partícules α , els coeficients lineals de les corbes dosi-efecte per cèl·lules en G2/M-PCC i pel total de cèl·lules no van mostrar diferències significatives, però ambdós van resultar ser significativament majors que l'obtingut per les cèl·lules en M (<0.01). Per al total de cèl·lules, el factor lineal observat ($1.8 \pm 0.021 \text{ Gy}^{-1}$) és entre 4 i 5 vegades superior a l'obtingut després d'irradiar amb raigs γ (Balakrishnan et al. 2010; Puig et al. 2013).

Kawata et al. (2004) utilitzant fibroblasts exposats a ions pesats de diferents energies (de 13 a 440 KeV/ μm), van trobar que la RBE obtinguda al comparar els coeficients α era extremadament elevada (en un rang de 7 a 71), i per això van proposar els fragments cromosòmics extra com un biomarcador característic d'exposicions a alta LET.

Finalment destacar que per a tots dos tipus de radiacions, es va observar una sobredispersió de la distribució cel·lular dels fragments cromosòmics extra,

fet que també es descriu en altres treballs tant per radiacions de baixa LET (Balakrishnan et al. 2010) com per radiacions d'alta LET (Kawata et al. 2002).

4.3.3. Cromosomes dicèntrics

Per a raigs γ , el coeficient α obtingut va ser de tres vegades superior al descrit per Barquinero et al. (1995). Aquesta diferència pot ser deguda als diferents rangs de dosi utilitzats per elaborar les corbes dosi-efecte.

Autors	Tipus, font i taxa de dosi	Dosis (Gy)	Tècnica	Coefficient $\alpha \pm SE \cdot Gy^{-1}$
RADIACIÓ DE BAIXA LET				
Barquinero et al. 1995	Raigs γ , Co ⁶⁰ (1.12Gy/min)	0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5	Colcemid	0.021 \pm 0.04
Treball 1, Puig et al. 2013	Raigs γ , Cs ¹³⁷ (5.37Gy/min)	0.5, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20	Colcemid	0.072 \pm 0.008
RADIACIÓ D'ALTA LET				
Schmidt et al. 1996	Partícules α , 2.7MeV (0.1Gy/min)	0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 0.5, 0.7 , 1.0	Colcemid	0.27 \pm 0.02
Barquinero et al. 2004	Partícules α , 2.7MeV (0.1Gy/min)	0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 0.5, 0.7 , 1.0	Colcemid	0.29 \pm 0.02
Treball 2, Puig et al. 2016	Partícules α , 2.7MeV (0.1Gy/min)	0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 1, 1.5, 2, 2.5	Caliculina-A + colcemid	0.072 \pm 0.008

Taula 4. Per a radiacions de baixa LET i alta LET, coeficients α descrits en les diferents corbes dosi-efecte per a cromosomes dicèntrics.

Per altra banda, el coeficient lineal de la corba de cromosomes dicèntrics amb partícules α va ser de 0.373 \pm 0.029, lleugerament superior als coeficients obtinguts anteriorment amb la mateixa font d'Americi 241 (Taula 4) (Schmidt et al. 1996; Barquinero et al. 2004). Aquesta lleugera diferència no va ser significativa, i podria ser deguda a l'ús de la tècnica de PCC en el nostre estudi. Després d'irradiació amb partícules α , Edwards et al. (1980), Purrot et al. (1980) i Moquet et al. (2001), van descriure uns coeficients lineals similars

DISCUSSIÓ

als mostrats a la taula 4, 0.37 ± 0.023 , 0.28 ± 0.015 i 0.244 ± 0.023 respectivament.

4.4. Validació de les corbes dosi-efecte de raigs γ amb simulacions d'irradiacions parcials.

En el cas d'una exposició parcial a RI, la distribució de les AC s'allunya d'una distribució de Poisson, i a mesura que augmenta la proporció de sang no irradiada, s'observa un augment de la sobredispersió. Un possible avantatge de la tècnica de PCC induïda químicament és l'estimació la dosi en casos d'exposicions parcials a altes dosis, i per això és important esbrinar quines AC ens permeten detectar desviacions de la distribució de Poisson en casos d'irradiació parcial.

Per a raigs γ , es van simular dues irradiacions parcials, una de 6 Gy i una altre de 12 Gy, ambdues amb el 50% de sang irradiada. Per als cromosomes en anell, es van estimar les dosis analitzant cèl·lules en G2/M-PCC, M/A-PCC, M i en el total de cèl·lules. En tots els casos, les dosis estimades van acostar-se molt a les dosis d'exposició, però amb un interval de confiança molt ampli. Pel que fa als fragments cromosòmics extra, es van estimar les dosis en cèl·lules en G2/M-PCC, M i en el total de cèl·lules. Les dosis estimades no van ser tant acurades com en el cas dels cromosomes en anell, especialment a 12 Gy, on es va subestimar la dosi, però els intervals de confiança van ser molt més estrets (Taula 5).

Dels resultats exposats es pot concloure que sols és possible detectar sobredispersió quan es consideren els cromosomes en anell. En les irradiacions homogènies la distribució dels fragments cromosòmics extra ja va mostrar una sobredispersió molt acusada, i per tant l'anàlisi de la

distribució de fragments cromosòmics extra no permet diferenciar correctament entre irradiacions homogènies o parcials.

La distribució dels cromosomes en anell en corbes dosi-efecte publicades utilitzant àcid ocaidaic, mostren una clara sobredispersió, el que les fa poc útils per l'estimació de la dosi en casos d'exposició parcial (Balakrishnan et al. 2010; Lindholm et al. 2009). En canvi utilitzant caliculina-A i colcemid, la distribució per cèl·lula dels cromosomes en anell s'ajusta més a una Poisson (Lamadrid et al. 2007 i treball 1 de la present tesi), i fa possible explorar la seva utilitat per casos d'irradiació parcial. Aquest fet pren una gran rellevància en casos d'accidents radiològics on l'exposició a la radiació pot no haver estat homogènia, que a més sovint es corresponen a accidents amb altes dosis d'exposició.

		6 Gy/50%		12 Gy/50%	
		Cromosomes en anell	Fragments cromosòmics extra	Cromosomes en anell	Fragments cromosòmics extra
D (D ₁ -D ₀)	G/M-PCC	7.34(-, 13.67)	5.53(5.00-6.04)	14.39 (-29.66)	8.10 (7.45-8.73)
	M/A-PCC	5.86 (-, 16.22)		8.60 (-, 19.26)	
	Total cèl·lules	7.17 (-, 16.59)	5.53 (5.00-6.04)	12.10 (-, 22.06)	8.10 (7.45-8.73)

Taula 5. Estimació de les dosis parcials pels cromosomes en anell i pels fragments cromosòmics extra en les cèl·lules en G2/M-PCC, M/A-PCC i en el total de cèl·lules.

4.5. Valoració del biomarcador més adequat per a l'estimació de la dosi

Tenint en compte el treball realitzat en la present tesi i els treballs descrits a la literatura, sembla ser que el mètode utilitzat per a la inducció química de la PCC té un impacte important. Això queda clar quan s'analitzen els coeficients lineals de les corbes de PCC amb anells (PCC-R).

DISCUSSIÓ

En el cas de les corbes dosi efecte de cromosomes en anell per a radiacions de baixa LET, el tractament amb caliculina-A i colcemid dona com a resultat una distribució que s'ajusta en general a una Poisson, el que permet aplicar aquest anàlisi tant per l'estimació d'irradiacions totals com parcials.

En relació a la irradiació amb partícules α , els cromosomes en anell no són gaire informatius degut a la seva baixa freqüència en els dos tipus de morfologies cel·lulars analitzades, G2/M-PCC i M. Els cromosomes dicèntrics observats en les cèl·lules en M han donat resultats similars a aquells obtinguts en altres estudis a partir del mètode clàssic, però a dosis elevades el número de cèl·lules en M és molt baix, el que impossibilita realitzar una relació dosi efecte estadísticament robusta. Per últim, les freqüències elevades de fragments cromosòmics extra i la seva relació amb la dosi fan d'aquesta AC un bon candidat a ser utilitzat com a biomarcador per establir corbes dosi-efecte després d'exposicions a dosis altes de radiacions d'alta LET.

5. CONCLUSIONS

1. Tant per a irradiacions amb raigs γ com amb partícules α , es va observar una clara reducció de la proporció de cèl·lules en metafase (M) i un augment de les cèl·lules interfàsiques G2/M-PCC a mesura que la dosi d'exposició augmentava. La reducció de les cèl·lules en M va resultar ser més acusada després de l'exposició a partícules α . Això indica, tal i com és d'esperar, que a una mateixa dosi, les cèl·lules exposades a partícules α mostren més dificultats per arribar a mitosi que les exposades a raigs γ .
2. Les cèl·lules descrites com a M/A-PCC, només es van observar en l'estudi realitzat amb raigs γ i la seva proporció va ser similar a totes les dosis. Aquest fet, indica que la seva presència podria ser deguda a la metodologia d'irradiació i cultiu utilitzada.
3. Per ambdós tipus de radiacions i per totes les morfologies cromosòmiques, la freqüència de cromosomes en anell va incrementar amb la dosi d'irradiació. La freqüència observada en cèl·lules en M/A-PCC va ser superior a la de les cèl·lules en G2/M-PCC i en M. Això indica que les cèl·lules M/A-PCC són probablement cèl·lules en G2 amb les cromàtides desalineades, i que la major freqüència de cromosomes en anell és probablement deguda a la major facilitat de detecció en cromosomes amb una sola cromàtide. Per tant, proposem que en el futur les cèl·lules M/A-PCC s'anomenin cèl·lules G2 amb cromàtides desalineades o G2/D-PCC. Les cèl·lules comunament anomenades G2/M-PCC es podrien anomenar cèl·lules en G2 o G2-PCC.
4. La freqüència de fragments cromosòmics extra en cèl·lules en G2/M-PCC va ser, en general, superior a la de cèl·lules en M. Això podria ser degut a la selecció negativa que pateixen les cèl·lules portadores d'alteracions cromosòmiques incompletes en el punt de control de G2/M.

CONCLUSIONS

5. Per a raigs γ , els coeficients α de les corbes dosi-efecte per cromosomes en anell de les cèl·lules G2/M-PCC i del total de cèl·lules van ser significativament inferiors al de les cèl·lules M/A-PCC. El coeficient lineal obtingut per les cèl·lules M/A-PCC va ser similar al descrit en altres estudis on la PCC s'ha induït amb àcid ocaidaic. La proporció de cèl·lules en M/A-PCC així com la relació entre els diferents tipus d'AC induïdes per la RI podria dependre d'alguns aspectes metodològics. Per aquest motiu, considerem necessari que els laboratoris de dosimetria biològica harmonitzin els protocols per establir corbes dosi-efecte i per fer anàlisis dosimètrics mitjançant la tècnica PCC.
6. Per a partícules α , i emprant la mateixa metodologia per induir la PCC, el coeficient lineal de la corba per cromosomes en anell va ser inferior al descrit per altres autors utilitzant altres radiacions d'alta LET, com per exemple els neutrons. La baixa freqüència de cromosomes en anell observats en el present treball, podria explicar-se per les condicions d'irradiació.
7. Els coeficients α de les corbes dosi-efecte dels fragments cromosòmics extra per ambos tipus de radiació, van ser significativament majors per a les cèl·lules G2/M-PCC que per les cèl·lules en M. L'elevada freqüència de fragments cromosòmics extra, molt acusada després d'irradiar amb partícules α , suggereix aquest tipus d'AC com un bon candidat a biomarcador d'exposicions a dosis altes de radiacions d'alta LET. Per baixa LET la seva sobredispersió els fa poc útils per a detectar casos d'exposicions parcials.
8. Quan s'utilitza caliculina-A i colcemid, la distribució dels cromosomes en anell s'ajusta a una distribució de Poisson, el que permet determinar si una exposició ha estat total o parcial, i estimar la dosi

rebuda per la porció irradiada. Els resultats obtinguts en les simulacions d'exposicions parcials han mostrat una bona correlació entre la dosi real d'irradiació i les dosis estimades quan es consideren els cromosomes en anell en el total de cèl·lules.

6. BIBLIOGRAFIA

A

- Ainsbury, E. A., Bakhanova, E., Barquinero, J. F., Brai, M., Chumak, V., Correcher, V., Darroudi, F., Fattibene, P., Gruel, G., Guclu, I., et al. (2011). Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures. *Radiation Protection Dosimetry*, 147(4), 573–592.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K. & Walter P. (2004). *Molecular Biology of the Cell*. 6th Edition. Garland Science. New York.
- Anderson, R. M., Marsden, S. J., Wright, E. G., Kadhim, M. A., Goodhead, D. T. & Griffin, C. S. (2000). Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET alpha-particles. *International Journal of Radiation Biology*, 76(1), 31–42.
- Anno, G., Young, R., Bloom, R. & Mercier, J. (2003). Dose response relationships for acute ionizing-radiation lethality, *Health Physics*, 84(5), 565–575.
- Antunes, A. C., Martins, V., Cardoso, J., Santos, L. & Monteiro Gil, O. (2014). The cytokinesis-blocked micronucleus assay: Dose estimation and inter-individual differences in the response to γ radiation. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 760, 17–22.

B

- Balakrishnan, S., Shirsath, K., Bhat, N. & Anjaria, K. (2010). Biodosimetry for high dose accidental exposures by drug induced premature chromosome condensation (PCC) assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 699(1-2), 11–16.
- Barquinero, J. F., Barrios, L., Caballín, M. R., Miró, R., Ribas, M., Subias, A. & Egozcue, J. (1995). Establishment and validation of a dose-effect curve for γ -rays by cytogenetic analysis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 326(1), 65–69.
- Barquinero, J. F., Cigarrán, S., Caballín, M. R., Braselmann, H., Ribas, M., Egozcue, J. & Barrios, L. (1999). Comparison of X-ray dose-response curves obtained by chromosome painting using conventional and PAINT nomenclatures. *International Journal of Radiation Biology*, 75(12), 1557–1566.
- Barquinero, J. F., Stephan, G. & Schmid, E. (2004). Effect of americium-241 alpha-particles on the dose-response of chromosome aberrations in human lymphocytes analysed by fluorescence *in situ* hybridization. *International Journal of Radiation Biology*, 80(2), 155–164.
- Bauchinger, M. & Schmid, E. (1998). LET dependence of yield ratios of radiation-induced intra- and interchromosomal aberrations in human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 74(1), 17–25.
- Bender, M. A. & Gooch, P. G. (1962). Types and rates of X-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiated *in vitro*. *Genetics*, 48(2), 522–532.

Boundless Biology. Control of the cell cycle.

<https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/cell-reproduction-10/control-of-the-cell-cycle-89/regulator-molecules-of-the-cell-cycle-399-11626/>.

C

Cornforth, M. N. & Bedford, J. S. (1983). X-ray-induced breakage and rejoining of human interphase chromosomes. *Science*, 222(4628), 1141–1143.

Cucinotta, F., Nikjoo, H. & Goodhead, D. (1998). The effects of delta-rays on the number of particle-track traversals per cell in laboratory and space exposures. *Radiation Research*, 150, 115–119.

D

Darroudi, F., Natarajan, A. T., Bentvelzen, P. A., Heidt, P. J., Van Rotterdam, A., Zoetelief, J. & Broerse, J. (1998.) Detection of total- and partial-body irradiation in a monkey model: a comparative study of chromosomal aberration, micronucleus and premature chromosome condensation assays. *International Journal of Radiation Biology*, 74(2), 207–215.

Deckbar, D., Jeggo, P. A. & Löbrich, M. (2011). Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 46(4), 271–283.

Dolphin, G. W. (1969). Biological dosimetry with particular reference to chromosomal aberration analysis. A review of methods. *Handling of Radiation Accidents. Procedures International Symposium*. Vienna: International Atomic Energy Agency, 215-224.

BIBLIOGRAFIA

Durante, M., Furusawa, Y. & Gotoh, E. (1998). A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry. *International Journal of Radiation Biology*, 74(4), 457–462.

E

Edwards, A., Lloyd, D. C. & Purrott, R. (1980). Radiation induced chromosome aberrations and the poisson distribution. *Radiation and Environmental Biophysics*, 16(2), 89–100.

G

George, K., Durante, M., Wu, H., Willingham, V. & Cucinotta, F. (2003). *In vivo* and *in vitro* measurements of complex-type chromosomal exchanges induced by heavy ions. *Advances in Space Research*, 31(6), 1525–1535.

Gotoh, E. & Asakawa, Y. (1996). Detection and evaluation of chromosomal aberrations induced by high doses of gamma-irradiation using immunogold-silver painting of prematurely condensed chromosomes. *International Journal of Radiation Biology*, 70(5), 517–520.

Gotoh, E. & Tanno, Y. (2005). Simple biodosimetry method for cases of high-dose radiation exposure using the ratio of the longest/shortest length of Giemsa-stained drug-induced prematurely condensed chromosomes (PCC). *International Journal of Radiation Biology*, 81(5), 379–385.

Gotoh, E. & Durante, M. (2006). Chromosome Condensation Outside Mitosis: Mechanisms and New Tools. *Journal of Cellular Physiology*, 209, 297–304.

Griffin, C. S., Marsden, S. J., Stevens, D. L., Simpson, P., & Savage, J. R. K. (1995). Frequencies of complex chromosome exchange aberrations induced by 238 Pu α -particles and detected by fluorescence *in situ* hybridization using single chromosome-specific probes. *International Journal of Oncology*, 67(4), 431–439.

H

Hall, E. J. & Giaccia, A. J. (2006). Radiobiology for the radiologists. L. W. & Wilkins, eds. 6th Edition, Philadelphia.

Hayata, I., Kanda, R., Minamihisamatsu, M., Furukawa, M. & Sasaki, M. S. (2001). Cytogenetical dose estimation for 3 severely exposed patients in the JCO criticality accident in Tokai-mura. *Journal of Radiation Research*, 42 Suppl, S149–155.

I

ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. Ann. ICRP 37 (2-4).

Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J. & Wang, H. (2003). DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*, 22(37), 5834–5847.

International Atomic Energy Agency (IAEA). (2011). Cytogenetic Dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. Vienna.

J

Jackson, S. P. & Bartek, J. (2010). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071–1078.

K

Kanda, R., Hayata, I. & Lloyd, D. C. (1999). Easy biodosimetry for high-dose radiation exposures using drug-induced, prematurely condensed chromosomes. *International Journal of Radiation Biology*, 75(4), 441–446.

Kanda, R., Minamihisamatsu, M. & Hayata, I. (2002). Dynamic analysis of chromosome aberrations in three victims of the Tokai-mura criticality accident. *International Journal of Radiation Biology*, 78(2), 857–862.

Kanda, R., Yamagishi, Y. & Hayata, I. (2004). Sister chromatid exchanges in ring chromosomes following X-irradiation of human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 80(5), 363–368.

Karachristou, I., Karakosta, A., Pantelias, A., Hatzi, V. I., Karaiskos, P., Dimitriou, P., Pantelias, G. E. & Terzoudi, G. (2015). Triage biodosimetry using centromeric/telomeric PNA probes and Giemsa staining to score dicentrics or excess fragments in non-stimulated lymphocyte prematurely condensed chromosomes. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 793, 107–114.

Kawata, T., Ito, H., Motoori, K., Ueda, T., Shigematsu, N., Furusawa, Y., Durante, M., George, K., Wu, H. & Cucinotta, F. A. (2002). Induction of chromatin damage and distribution of isochromatid breaks in human

fibroblast cells exposed to heavy ions. *Journal of Radiation Research*, 43 Suppl, S169-173.

Kawata, T., Ito, H., George, K., Wu, H. & Cucinotta, F. A. (2004). Chromosome aberrations induced by high-LET radiations. *Biological Sciences in Space*, 15(4), 216–223.

Kovacs, M. S., Evans, J. W., Johnstone, I. M. & Brown, J. M. (1994). Radiation-induced damage, repair and exchange formation in different chromosomes of human fibroblasts determined by fluorescence *in situ* hybridization. *Radiation Research*, 137(1), 34–43.

L

Lamadrid, A. I., García, O., Delbos, M., Voisin, P. & Roy, L. (2007). PCC-ring induction in human lymphocytes exposed to gamma and neutron irradiation. *Journal of Radiation Research*, 48(1), 1–6.

Lamadrid, A. I., González, J. E., García, O., Voisin, P. & Roy, L. (2011). Prematurely condensed chromosome rings after neutron irradiation of human lymphocytes. *Journal of Radiation Research*, 52(4), 531–535.

Lans H., Martejin, J. A. & Vermeulen, W. (2012). ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics & Chromatin*, 5(1), 4-14.

Lea, D. & Catheside, D. (1942). Induction by radiation chromosome aberrations in *Tradescantia*. *Journal of Genetics*, 44(2), 216–245.

Lee, R., Yamada, S., Yamamoto, N., Miyamoto, T., Ando, K., Durante, M. & Tsujii, H. (2011). Chromosome aberration measurements in mitotic and G 2-PCC lymphocytes at the standard sampling time of 48 h

BIBLIOGRAFIA

underestimate the effectiveness of high-LET particles. *Radiation and Environmental Biophysics*, 50(3), 371–381.

Lehnert S. 2008. Biomolecular Action of Ionizing Radiation. 1st Edition. Taylor & Francis Group, LLC. New York.

Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 181–211.

Lindholm, C., Romm, H., Stephan, G., Schmid, E., Moquet, J. & Edwards, A. (2002). Intercomparison of translocation and dicentric frequencies between laboratories in a follow-up of the radiological accident in Estonia. *International Journal of Radiation Biology*, 78(10), 883–890.

Lindholm, C., Stricklin, D., Jaworska, A., Koivistoinen, A., Paile, W., Arvidsson, E., Deperas-Standylo, J. & Wojcik, A. (2009). Premature chromosome condensation (PCC) assay for dose assessment in mass casualty accidents. *Radiation Research*, 173(1), 71–78.

Lücke-Hulhle, C., Hiebert, L. & Wegner, R. (1983). Caffeine-mediated release of alpha-radiation-induced G2 arrest increases the yield of chromosome aberrations. *International Journal of Radiation Biology*, 43(2), 123-132.

M

Mestres, M., Caballin, M. R., Schmid, E., Stephan, G., Sachs, R., Barrios, L. & Barquinero, J. F. (2004). Analysis of α -particle induced chromosome aberrations in human lymphocytes, using pan-centromeric and pan-telomeric probes. *International Journal of Radiation Biology*, 80(10), 737–744.

- Mladenov, E. & Iliakis, G. (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1-2), 61–72.
- Moquet, J., Barnard, S. & Rothkamm, K. (2014). Gamma-H2AX biodosimetry for use in large scale radiation incidents: comparison of a rapid “96 well lyse/fix” protocol with a routine method. *PeerJ*, 2, e282.
- Moquet, J. E., Fernández, J. L., Edwards, A. A. and Lloyd, D. C. (2001). Lymphocyte chromosomal aberrations and their complexity induced in vitro by plutonium-239 alpha-particles and detected by FISH. *Cell Molecular Biology*, 47(3), 549–556.

N

- Natajara, A. & Obe, G. (1983). Influence of DNA repair on radiation-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes. In T. Ishihara & M. S. Sasaki, eds. *Radiation-induced chromosome damage in man*. New York, 124–140.
- Niida, H. & Nakanishi, M. (2006). DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*, 21(1), 3–9.
- Norman, A. & Sasaki, M. S. (1966). Chromosome-exchange aberrations in human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 11(4), 321–328.

O

- Oestreicher, U., Samaga, D., Ainsbury, E., Antunes, A. C., Baeyens, A., Barrios, L., Beinke, C., Beukes, P., Blakely, W. F., Cucu, A., et al. (2016). RENE

BIBLIOGRAFIA

intercomparisons applying the conventional Dicentric Chromosome Assay (DCA). *International Journal of Radiation Biology*, 3002, 1–10.

P

Pantelias, G. E. & Maillie, H. D. (1983). A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol. *Somatic Cells and Molecular Genetics*, 9(5), 533–547.

Polo, S. E. & Jackson, S. P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes & Development*, 25(5), 409–433.

Prasanna, P. G., Escalada, N. D. & Blakely, W. F. (2000). 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. *Mutation Research*, 466(2), 131–141.

Preston, R. J. (1990). Biological dosimetry mechanistic concepts. In I Reunión internacional sobre dosimetria biológica. Madrid, 21–34.

Puig, R., Barrios, L., Pujol, M., Caballin, M. R. & Barquinero, J. F. (2013). Suitability of scoring PCC rings and fragments for dose assessment after high-dose exposures to ionizing radiation. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 757(1), 1–7.

Puig, R., Pujol, M., Barrios, L., Caballín, M. R. & Barquinero, J. F. (2016). Analysis of α -particle-induced chromosomal aberrations by

chemically-induced PCC. Elaboration of dose-effect curves. *International Journal of Radiation Biologoy*, 92(9), 493-501.

Pujol, M., Barquinero, J. F., Puig, P., Puig, R., Caballín, M. R. & Barrios, L. (2014). A new model of biodosimetry to integrate low and high dose s. *PLoS ONE*, 9(12), 1–19.

Pujol, M., Barrios, L., Puig, P., Caballin, M. R. & Barquinero, J. F. (2016). A New Model for Biological Dose Assessment in Cases of Heterogeneous Exposures to Ionizing Radiation. *Radiation Research*, 185(2), 151–162.

Purrott RJ, Vulpis N, Lloyd DC (1980) The use of harlequin staining to measure delay in the human lymphocyte cell cycle induced by in vitro X-irradiation. *Mutatation Research*, 69, 275–282.

R

Radiation Effects Research Foundation. How radiation affect cells.

<http://www.rerf.jp/radefx/basicknowledge/radcell.htm>.

Rao, C. R. (1965). The theory of least squares when the parameters are stochastic and its application to the analysis of growth curves. *Biometrika*, 52(3), 447–458.

Rao, P. N. & Johnson, R. T. (1970). Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature*, 225, 159–164.

Rastkhah, E., Zakeri, F., Ghoranneviss, M., Rajabpour, M. R., Farshidpour, M. R., Mianji, F. & Bayat, M. (2016). The cytokinesis-blocked micronucleus assay: dose-response calibration curve, background frequency in the population and dose estimation. *Radiation and Environmental Biophysics*, 55, 41-51.

BIBLIOGRAFIA

- Ritter, S., Nasonova, E., Furusawa, Y. & Ando, K. (2002). Relationship between aberration yield and mitotic delay in human lymphocytes exposed to 200 MeV/u Fe-ions or X-rays. *Journal of Radiation Research*, 43 Suppl, 175-179.
- Roch-Lefèvre, S., Mandina, T., Voisin, P., Gaëtan, G., González, J. E., Valente, M., Bonnesoeur, P., García, O., Voisin, P., & Roy, L. (2010). Quantification of gamma-H2AX foci in human lymphocytes: a method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure. *Radiation Research*, 174(2), 185–194.
- Rodríguez, P., Barquinero, J. F., Duran, A., Caballin, M. R., Ribas, M. & Barrios, L. (2009). Cells bearing chromosome aberrations lacking one telomere are selectively blocked at the G2/M checkpoint. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 670(1-2), 53–58.
- Romero, I., García, O., Lamadrid, A. I., Gregoire, E., González, J. E., Morales, W., Martin, C., Barquinero, J. F. & Voisin, P. (2013). Assessment of simulated high-dose partial-body irradiation by PCC-R assay. *Journal of Radiation Research*, 54(5), 863–871.
- Romm, H., Ainsbury, E., Barnard, S., Barrios, L., Barquinero, J. F., Beinke, C., Deperas, M., Gregoire, E., Koivistoinen, A., Lindholm, C., et al. (2013). Automatic scoring of dicentric chromosomes as a tool in large scale radiation accidents. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 756(1–2), 174–183.
- Romm, H., Ainsbury, E., Barnard, S., Barrios, L., Barquinero, J. F., Beinke, C., Deperas, M., Gregoire, E., Koivistoinen, A., Lindholm, C., et al. (2014). Validation of semi-automatic scoring of dicentric chromosomes after

simulation of three different irradiation scenarios. *Health Physics*, 106(6), 764–771.

Romm, H., Ainsbury, E. A., Barquinero, J. F., Barrios, L., Beinke, C., Cucu, A., Domene, M. M., Filippi, S., Monteiro Gil, O., Gregoire, E. *et al.* (2016). Web based scoring is useful for validation and harmonisation of scoring criteria within RENEB. *International Journal of Radiation Biology*, 3002, 1–8.

Rothkamm, K. & Löbrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 5057–5062.

S

San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 229–257.

Sasaki, M. S. & Miyata, H. (1968). Biological dosimetry in atomic bomb survivors. *Nature*, 220, 1189–1193.

Sasaki, M. S. (2003). Chromosomal biodosimetry by unfolding a mixed Poisson distribution: a generalized model. *International Journal of Radiation Biology*, 79(2), 83–97.

Savage, J. R. K. (1996). Insight into sites. *Mutation Research*, 366, 81–95.

Schmid, E., Hieber, L., Heinzmann, U. & Roos, H. (1996). Analysis of chromosome aberrations in human peripheral lymphocytes induced by in vitro alpha-particle irradiation. *Radiation and Environmental Biophysics*, 35, 179–184.

BIBLIOGRAFIA

- Schmid, E. & Roos, H. (2009). Influence of the bystander phenomenon on the chromosome aberration pattern in human lymphocytes induced by *in vitro* α -particle exposure. *Radiation and Environmental Biophysics*, 48(2), 181–187.
- Schmid, T., Oestreicher, U., Molls, M. & Schmid, E. (2011). Alpha particles induce different F values in monocellular layers of settled and attached human lymphocytes. *Radiation Research*, 176(2), 226-233.
- Sevan'kaev, A. V. Khvostunov, I. K., Mikhailova, G. F., Golub, E. V., Potetnya, O. I., Shepel, N. N., Nugis, V. Y. & Nadejina, N. M. (2000). Novel data set for retrospective biodosimetry using both conventional and FISH chromosome analysis after high accidental overexposure. *Applied Radiation and Isotopes*, 52(5), 1149–1152.
- Sigurdson, A. J., Ha, M., Hauptmann, M., Bhatti, P., Sram, R. J., Beskid, O. & Tucker, J. D.(2008). International study of factors affecting human chromosome translocations. *Mutation Research*, 652(2), 112– 121.
- Stannered. Commons wikimedia. Alfa beta gamma radiation penetration. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alfa_beta_gamma_radiation_penetration.svg
- Sulli, G., Di Micco, R & Di Fagagna, F. A. (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), 709–720.

V

- Vinnikov, V. A. and Maznyk, N. A. (2013). Cytogenetic dose-response *in vitro* for biological dosimetry after exposure to high doses of gamma-rays. *Radiation Protection Dosimetry*, 154(2), 186–197.

W

- Wang, Z. Z., Li, W. J., Zhi, D. J., Jing, X. G., Wei, W., Gao, Q. X. & Liu, B. (2007). Biodosimetry estimate for high-LET irradiation. *Radiation and Environmental Biophysics*, 46(3), 229–235.
- Ward, J. F. (1981). Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation-produced free radicals. *Radiation Research*, 86(2), 185–195.
- Ward, J. F. (1985). Biochemistry of DNA lesions. *Radiation Research Supplement*, 8(2), S103–S111.
- Waselenko, J. K., MacVittie, T. J., Blacely, W., Pesik, N., Wiley, A., Dickerson, W., Tsu, H., Confer, D., Coleman, N., Seed, T., et al. (2004). Clinical Guidelines Medical Management of the Acute Radiation Syndrome : Recommendations of the Strategic National Stockpile. *Annals of Internal Medicine*, 140, 1037-1051.
- Willis, N. & Rhind, N. (2009). Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Division*, 4, 13.
- Wojcik, A., Gregoire, E., Hayata, I., Roy, L., Sommer, S., Stephane, G. & Voisin, P. (2004). Cytogenetic damage in lymphocytes for the purpose of dose reconstruction: A review of three recent radiation accident- *Cytogenetic and Genome Research*, 104(1–4), 200–205.
- Wu, H., George, K., Kawata, T., Willingham, V. & Cucinotta, F. A. (2001). Comparison of F ratios generated from interphase and metaphase chromosome damage induced by high doses of low- and high-LET radiation. *Radiation Research*, 155, 55–62.

BIBLIOGRAFIA

Wyman, C. & Kanaar, R. (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annual Review of Genetics.*, 40, 363–383.

Y

Yao, B., Jiang, B. R., Ai, H. S., Li, Y. F., Liu, G. X., Man, Q. H. & Qiu, L. J. (2010). Biological dose estimation for two severely exposed patients in a radiation accident in Shandong Jining, China, in 2004. *International Journal of Radiation biology*, 86(9), 800–808.

Yao, B., Li, Y., Liu, G., Guo, M., Bai, J., Man, Q., Qiu, L. & Ai, H. (2013). Estimation of the biological dose received by five victims of a radiation accident using three different cytogenetic tools. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 751(1), 66–72.

