

---

Alteracions cromosòmiques radioinduides:  
Estudis en irradiacions parcials i retrospectius

Memòria presentada per  
Assumpta Duran Puig

Per optar al grau de  
Doctora en Biologia Cel·lular

Tesi dirigida per  
Dr. Leonardo Barrios Sanromá  
Dr. Joan Francesc Barquinero Estruch

Unitat de Biologia cel·lular  
Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia  
Facultat de Biociències  
Universitat Autònoma de Barcelona

Dr. Leonardo Barrios Sanromá

Dr. J. Francesc Barquinero Estruch

Assumpta Duran Puig

Universitat Autònoma de Barcelona  
Cerdanyola del Vallès. Juliol 2010

---



als meus pares i a la meva germana  
als meus avis que sempre estan amb mi  
al tiet i a tota la família

pel seu amor i suport



Allà d'allà de l'espai  
he vist somriure una estrella  
perduda en lo front del cel  
com espiga en temps de sega,  
com al pregon de l'afrau  
una efímera lluerna.  
-Estrelleta -jo li he dit-,  
de la mar cerúlea gemma,  
¿de les flors de l'alt verger  
series tu la darrera?

-No só la darrera, no;  
no só més que una llanterna  
de la porta del jardí  
que creies tu la frontera.  
És sols lo començament  
lo que prenies per terme.  
L'univers és infinit,  
pertot acaba i comença,  
i ençà, enllà, amunt i avall,  
la immensitat és oberta,  
i a on tu veus lo desert  
eixams de móns formiguegen.

PLUS ULTRA  
Jacint Verdaguer



# Index

|                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introducció</b> . . . . .                                                                      | <b>1</b>  |
| 1.1. Radiacions ionitzants . . . . .                                                                 | 3         |
| 1.1.1. Mecanismes d'interacció amb la matèria . . . . .                                              | 3         |
| 1.1.2. Unitats de Dosimetria . . . . .                                                               | 5         |
| 1.2. Radiacions ionitzants com a inductores d'alteracions cromosòmiques .                            | 6         |
| 1.2.1. Principals tipus d'alteracions cromosòmiques induïdes per les radiacions ionitzants . . . . . | 9         |
| 1.3. Dosimetria biològica . . . . .                                                                  | 12        |
| 1.3.1. Metodologies utilitzades . . . . .                                                            | 12        |
| 1.3.2. Corbes dosi-efecte . . . . .                                                                  | 13        |
| 1.4. Irradiacions parcials . . . . .                                                                 | 14        |
| 1.5. Persistència de les diferents alteracions cromosòmiques. . . . .                                | 15        |
| <b>2. Hipòtesi</b> . . . . .                                                                         | <b>17</b> |
| <b>3. Objectius.</b> . . . . .                                                                       | <b>21</b> |
| 3.1. Estudi de parcialitat . . . . .                                                                 | 23        |
| 3.2. Estudi retrospectiu . . . . .                                                                   | 23        |
| <b>4. Material i mètodes</b> . . . . .                                                               | <b>25</b> |
| 4.1. Obtenció de les mostres . . . . .                                                               | 27        |
| 4.2. Condicions d'irradiació . . . . .                                                               | 27        |
| 4.3. Condicions de cultiu . . . . .                                                                  | 28        |
| 4.3.1. Sang perifèrica . . . . .                                                                     | 28        |
| 4.3.1. Sang perifèrica . . . . .                                                                     | 28        |

|                                                                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3.2. Línia cel·lular Jurkat . . . . .                                                                          | 29        |
| 4.4. Tècniques de tinció cromosòmica . . . . .                                                                   | 29        |
| 4.4.1. Pintat dels cromosomes 1, 4 i 11 mitjançant tècniques d'hibridació "in situ" fluorescent (FISH) . . . . . | 29        |
| 4.4.1.1. Hibridació clàssica . . . . .                                                                           | 29        |
| 4.4.1.2. Hibridació optimitzada . . . . .                                                                        | 30        |
| 4.4.2. mFISH (multiplex Fluorescent In Situ Hibridization) . . . . .                                             | 31        |
| 4.5. Criteri d'anàlisi i nomenclatura utilitzada . . . . .                                                       | 32        |
| 4.5.1. Pintat cromosòmic . . . . .                                                                               | 32        |
| 4.5.2. mFISH . . . . .                                                                                           | 37        |
| 4.6. Anàlisi estadística . . . . .                                                                               | 40        |
| 4.6.1. Estudi d'irradiacions parcials . . . . .                                                                  | 40        |
| 4.6.1.1. Determinació de la parcialitat . . . . .                                                                | 40        |
| 4.6.1.2. Estimació de la dosi . . . . .                                                                          | 42        |
| 4.6.2. Estudi de la persistència de les alteracions al llarg del temps post-irradiació . . . . .                 | 42        |
| <b>5. Resultats . . . . .</b>                                                                                    | <b>45</b> |
| 5.1. Irradiacions parcials . . . . .                                                                             | 47        |
| 5.1.1. Resultats citogenètics . . . . .                                                                          | 47        |
| 5.1.2. Detecció de la sobredispersió . . . . .                                                                   | 52        |
| 5.1.3. Estimació de la dosi d'exposició . . . . .                                                                | 63        |
| 5.1.4. Anàlisi de cèl·lules estables . . . . .                                                                   | 68        |
| 5.2. Persistència de les alteracions cromosòmiques a llarg termini . . . . .                                     | 70        |
| 5.2.1. Estudi preliminar . . . . .                                                                               | 70        |
| 5.2.2. Estudi amb FISH painting . . . . .                                                                        | 70        |



|                                                                                                                                    |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2.3. Estudi amb mFISH . . . . .                                                                                                  | 73         |
| 5.2.3.1. Resultats citogenètics . . . . .                                                                                          | 73         |
| 5.2.3.2. Anàlisi de les alteracions complexes . . . . .                                                                            | 75         |
| 5.2.3.3. Sensibilitat cromosòmica . . . . .                                                                                        | 76         |
| 5.2.3.4. Associacions cromosòmiques preferencials . . . . .                                                                        | 81         |
| <b>6. Discussió . . . . .</b>                                                                                                      | <b>85</b>  |
| 6.1. Irradiacions parcials . . . . .                                                                                               | 87         |
| 6.1.1. Resultats citogenètics . . . . .                                                                                            | 87         |
| 6.1.2. Utilitat de les tècniques de FISH en la detecció d'irradiacions<br>parcials i en la determinació de la dosi . . . . .       | 88         |
| 6.2. Persistència de les alteracions cromosòmiques a llarg termini . . . . .                                                       | 91         |
| 6.2.1. Persistència de les alteracions cromosòmiques amb pintat<br>cromosòmic . . . . .                                            | 91         |
| 6.2.2. Estudi amb mFISH . . . . .                                                                                                  | 93         |
| 6.2.3. Sensibilitat cromosòmica . . . . .                                                                                          | 94         |
| <b>7. Conclusions . . . . .</b>                                                                                                    | <b>97</b>  |
| <b>8. Bibliografia . . . . .</b>                                                                                                   | <b>101</b> |
| <b>9. Annexes . . . . .</b>                                                                                                        | <b>113</b> |
| 9.1. Suitability of FISH painting techniques for the detection of partial-<br>body irradiations for biological dosimetry . . . . . | 115        |
| 9.2. Persistence of radiation-induced chromosome aberrations in a long-<br>term cell culture . . . . .                             | 123        |
| <b>10. Agraïments . . . . .</b>                                                                                                    | <b>137</b> |



# 1. INTRODUCCIÓ



La radioactivitat existeix d'una forma natural, però en el darrer segle cada dia és més present, tant pel desenvolupament de l'energia nuclear com per les seves aplicacions en el camp mèdic i industrial. Per això, és important conèixer els efectes de la radiació ionitzant en l'espècie humana, per tal d'establir límits a l'exposició i controlar si en alguns casos s'ha donat una sobreexposició.

## 1.1. Radiacions ionitzants

La radiació ionitzant és aquella que al travessar la matèria té prou energia per induir ionitzacions en els àtoms que la formen. Hi ha dos tipus de radiacions ionitzants, les ones electromagnètiques (fotons), com els raigs  $\gamma$  i els raigs X que no tenen massa ni càrrega, i les radiacions corpusculars que tenen massa i/o càrrega, com els neutrons, les partícules  $\alpha$  i les radiacions  $\beta$ .

### 1.1.1. Mecanismes d'interacció amb la matèria

Quan la radiació ionitzant travessa un material, experimenta una sèrie de col·lisions amb els àtoms que el formen. La ionització es produeix quan l'energia transferida a l'electró atòmic és suficient per arrencar-lo de l'àtom. Aquesta energia prové de l'energia cinètica de la radiació ionitzant. En aquest cas, l'electró atòmic s'ha convertit en una partícula lliure amb una energia cinètica i l'àtom en un ió positiu. Aquest procés s'anomena ionització primària.

Molts dels electrons alliberats en el procés d'ionització primària tenen energia suficient per a produir noves ionitzacions en altres àtoms, ionitzant-los. La ionització produïda per aquest electró alliberat del medi s'anomena ionització secundària.

Els fotons interactuen amb el material de tres formes diferents (figura 1):

**Efecte fotoelèctric:** L'energia del fotó incident és totalment absorbida per un electró. Una part de l'energia, superior a la de l'enllaç, permet a l'electró alliberar-se de l'àtom, i l'altra part la utilitza com a energia cinètica de moviment.

Efecte Compton: El fotó desallotja un electró d'una òrbita exterior d'un àtom. L'energia del fotó incident és en part donada a un electró desallotjat i la resta queda en el fotó dispersat.

Producció de parells o materialització: El fotó, al interaccionar amb l'àtom provoca la formació d'un electró i d'un positró.

Aquests tres mecanismes són els responsables de més del 99% de les interaccions que tenen lloc entre els fotons i la matèria. I succeeix un o un altre en funció de l'energia del fotó i del medi que travessa. No obstant això, aquestes interaccions són de naturalesa quàntica. Això significa que una interacció específica mai està garantida, simplement és més o menys probable depenent de l'energia dels fotons i dels materials amb els quals interacciona. En general l'efecte fotoelèctric és el mecanisme dominant quan els fotons tenen energies per sota de 50 keV, l'efecte Compton és més freqüent en el rang d'energies mitjanes, entre 100 keV i 25 MeV, i la producció de parells es produeix en energies a partir dels 1,02 MeV (figura 2).

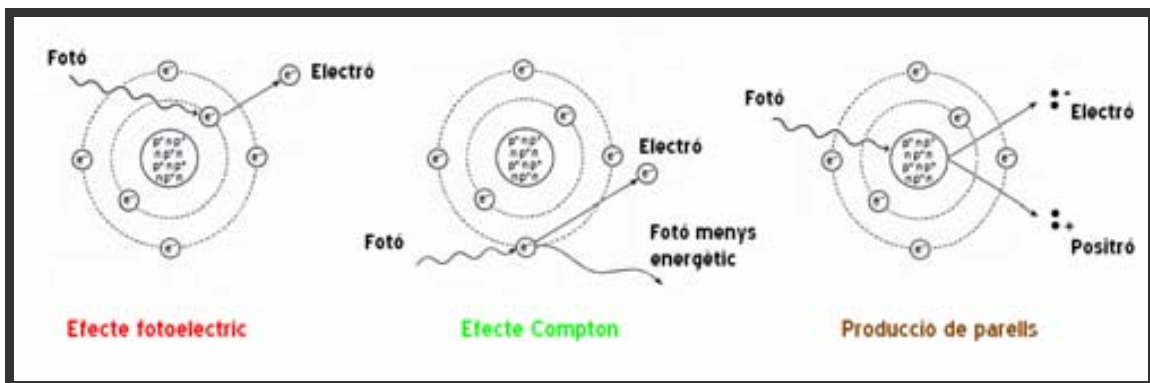


Figura 1. Principals fenòmens d'interacció dels fotons amb la matèria. Figura adaptada de (Hall and Giaccia 2006).

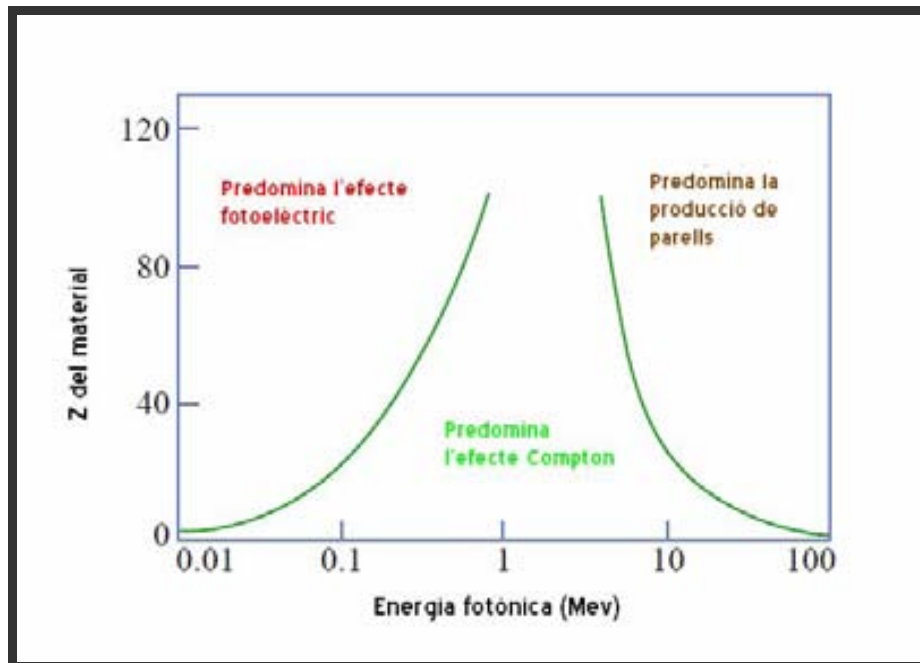


Figura 2. Mecanismes predominant de la interacció dels fotons amb la matèria en funció de l'energia del fotó i el nombre atòmic del material amb el qual interacciona. Figura adaptada de (Zaider and Rossi 2001).

### 1.1.2. Unitats de Dosimetria

Es defineix la dosi absorbida ( $D$ ) com l'energia dipositada per unitat de massa. La seva unitat en el sistema internacional és el Joule per Quilogram ( $J \cdot Kg^{-1}$ ), i s'anomena Gray (Gy).

$$D = d\varepsilon/dm \quad eq 1$$

On “ $D$ ” és la dosi absorbida, “ $d\varepsilon$ ” és l'energia absorbida per una unitat de massa “ $dm$ ” del material que ha rebut la radiació.

Per valorar l'efecte biològic d'una irradiació s'ha de considerar la dosi absorbida, i com aquesta s'ha dipositat en el medi. En aquest sentit es defineix la LET (Transferència Lineal d'Energia) com l'energia mitjana dipositada al llarg del recorregut d'una partícula per unitat de longitud, expressant-se en  $KeV \cdot \mu m^{-1}$  (o bé  $J \cdot m^{-1}$ ). En funció de la LET, les radiacions ionitzants es poden classificar en radiacions de baixa LET i de alta LET. Les radiacions de baixa LET dipositen menys energia per unitat de longitud que les de alta LET, però tenen prou energia cinètica com per travessar distàncies

considerables en els teixits. Són radiacions ionitzants de baixa LET els raigs X i  $\gamma$ . Quan es relaciona la dosi absorbida i els efectes biològics, podem veure que per a una mateixa dosi absorbida els efectes biològics de diferents tipus de radiacions són diferents. Això és degut a que les radiacions ionitzants tenen diferents LET, i per tant, cada radiació té una Eficàcia Biològica Relativa (EBR) diferent. L'EBR és el quocient que relaciona l'efecte biològic d'una dosi d'una radiació determinada amb l'efecte biològic de la mateixa dosi d'una radiació de referència (normalment raigs X de 250 KeV).

Per tenir en compte els factors anteriors, es defineix la dosi equivalent (H), com la dosi absorbida per un teixit, òrgan o la totalitat de l'organisme, corregida per un factor de qualitat (w) que es característic per cada tipus d'energia i radiació.

La dosi equivalent (H) d'un teixit s'expressa amb la següent equació:

$$H_T = W_R \cdot D_{TR} \quad eq\ 2$$

On  $D_{TR}$  és la mitjana de les dosis absorbides per un teixit T degut a una radiació R i  $W_R$  és un coeficient adimensional, que en el cas dels raigs X és 1 (ICRP 92 2004). La unitat de la dosi equivalent és la mateixa que la de la dosi absorbida, és a dir el Joule per Quilogram ( $J \cdot Kg^{-1}$ ) i s'anomena Sievert (Sv).

## 1.2. Radiacions ionitzants com a inductores d'alteracions cromosòmiques

Dins la cèl·lula, la molècula que conté la informació pel seu funcionament és el DNA. Per tant, la inducció de modificacions en el DNA pot perjudicar el funcionament correcte de la cèl·lula.

La forma en que les radiacions ionitzants poden produir dany en el DNA pot ser directa o indirecta (Hall and Giaccia 2006) (figura 3). És directa quan la radiació ionitzant provoca una ionització directa del DNA, provocant un trencament o modificacions en algun dels seus enllaços, i és indirecta quan interacciona amb alguna altra molècula propera, generalment l'aigua,



provocant la formació de radicals lliures, que són els que interaccionarien amb el DNA causant-li danys.

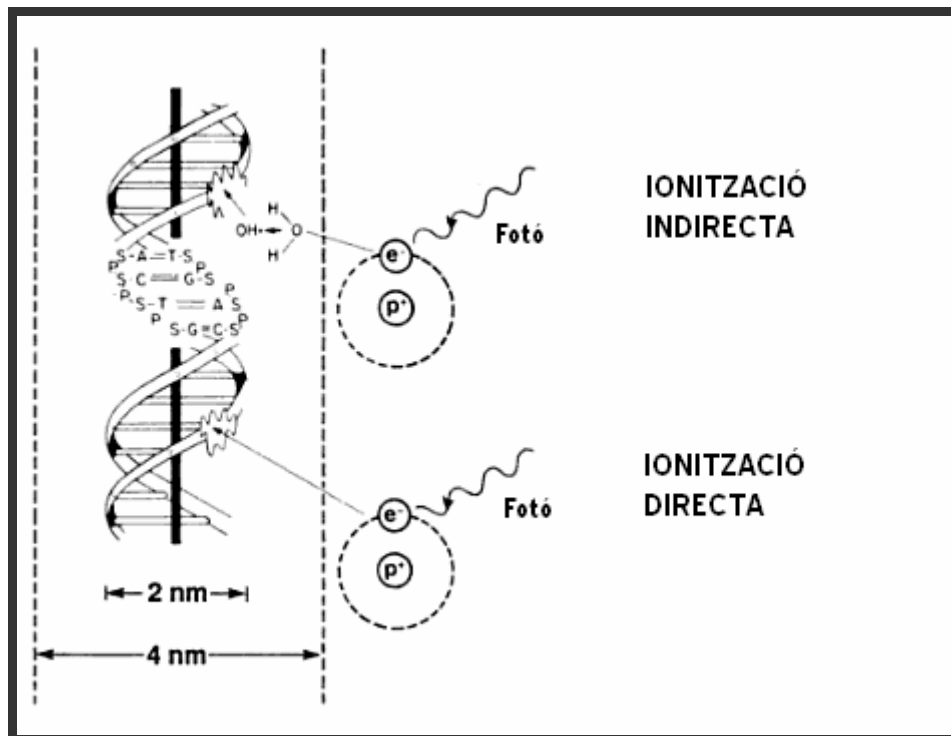


Figura 3. Esquema de la ionització directa i indirecta de les radiacions ionitzants produïda en el DNA. Figura adaptada de (Hall and Giaccia 2006).

Els tres tipus més freqüents de danys radioinduits en el DNA són: trencaments d'una o dues cadenes de DNA (SSB i DSB), alteració de les molècules de sucre i de les bases, i substitució i delecio de bases. Altres tipus de danys en el DNA induïts per les radiacions, com per exemple entrecreuaments DNA-proteïnes són menys freqüents.

Els DSB són els que estan més directament relacionats amb la formació d'alteracions cromosòmiques (Chadwick and Leenhouts 1981, Natarajan 1984). La delecio de bases i els SSB també poden derivar a trencaments de doble cadena i en ser reparats erròniament poden donar lloc a alteracions cromosòmiques (Gulston *et al.* 2004).

Davant d'un dany radioinduit en el DNA, s'activa la maquinària de reparació de manera que, o bé es restitueix la configuració original, o bé no es repara el dany quedant els extrems oberts generant delecions terminals, o bé es repara de forma incorrecta generant una alteració cromosòmica d'intercanvi.

Per la reparació del DSB, s'han descrit dos mecanismes: “Non-Homologous End Joining” (NHEJ) i “Homologous Recombination” (HR) (figura 4). En la via NHEJ, els dos extrems lliures són processats i units. Aquest processament sembla que és susceptible d'errors. En la via HR, el DSB es repara mitjançant la homologia d'un cromosoma no danyat, i es considera com un mecanisme lliure d'errors.

S'han proposat diversos models (Savage 1998) que expliquen la formació de les alteracions cromosòmiques radioinduides:

1.- El model "breakage-and-reunion", també anomenat “breakage first” (Sax 1940), proposa que una aberració cromosòmica es forma quan els extrems lliures de dos DSB s'uneixen durant la reparació. A nivell molecular aquest mecanisme correspon al NHEJ.

2.- El model “recombinatorial misrepair” molecular (Chadwick and Leenhouts 1978), proposa que un únic DSB interaccionaria durant la seva reparació amb una seqüència homologa no danyada. A nivell molecular aquest mecanisme correspon al HR.

3.- El model d'intercanvi de Revell (Revell 1959), proposa que dues lesions radioinduides, no DSB, interaccionen per formar l'alteració cromosòmica.

Les dades experimentals indiquen que el model “breakage and reunion” és el que millor explica la formació d'alteracions cromosòmiques que s'originen en la fase  $G_0/G_1$ .

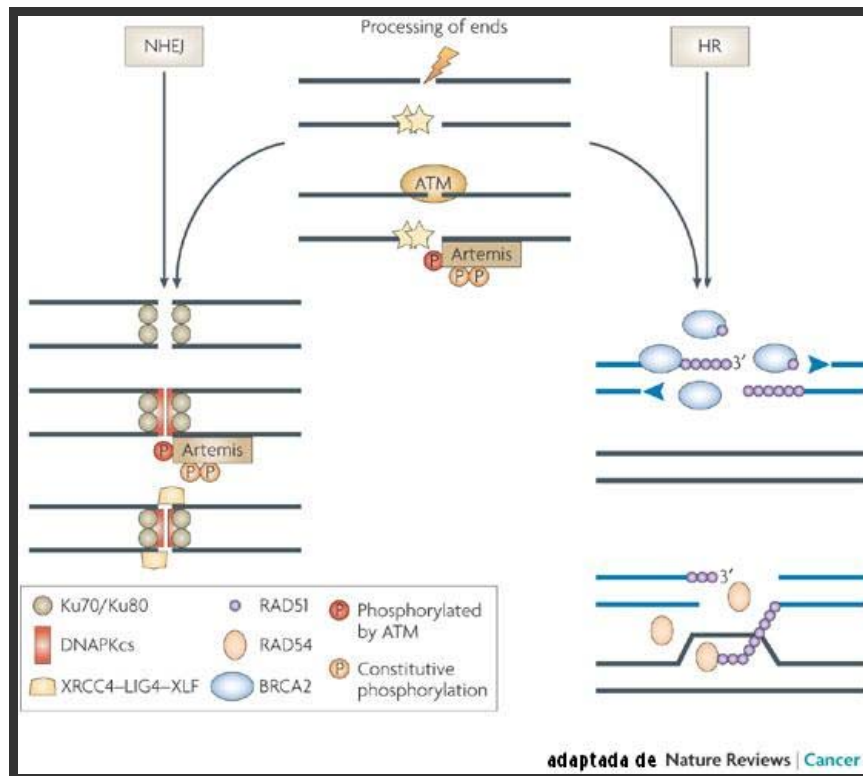


Figura 4. Esquema de les vies de reparació NHEJ i HR. Figura adaptada de (Lobrich and Jeggo 2007).

### 1.2.1. Principals tipus d'alteracions cromosòmiques induïdes per les radiacions ionitzants

Si diversos DSB coexisteixen en el temps la seva reparació pot donar lloc a diferents tipus de reorganitzacions cromosòmiques (figura 5).

Les alteracions intracromosòmiques es generen quan dos trencaments afecten a un mateix cromosoma, com per exemple:

- a) una inversió cromosòmica, que pot ser pericèntrica quan inclou el centròmer i paracèntrica quan no l'inclou.
- b) un anell, que pot ser cèntric o acèntric si conté o no el centròmer.

Les alteracions intercromosòmiques, es generen per dos o més trencaments que afecten a un mínim de dos cromosomes, com per exemple:

a) una translocació recíproca, que és una reordenació equilibrada que es dona quan entre dos cromosomes s'intercanvia material distal, sense centròmer.

b) un dicèntric, quan es reuneixen per un costat els fragments que contenen centròmer i per l'altre els fragments que no en contenen, formant aquests últims un fragment acèntric.

c) una inserció, que és el resultat de tres trencaments, dos en un cromosoma formant un fragment cromosòmic intersticial amb els extrems lliures que s'insereix en una altre cromosoma que també s'ha trencat.

Les anomalies cromosòmiques estructurals es descriuen per convenció i es poden consultar en el International "System Human for Cytogenetic Nomenclature" (ISCN 2009).

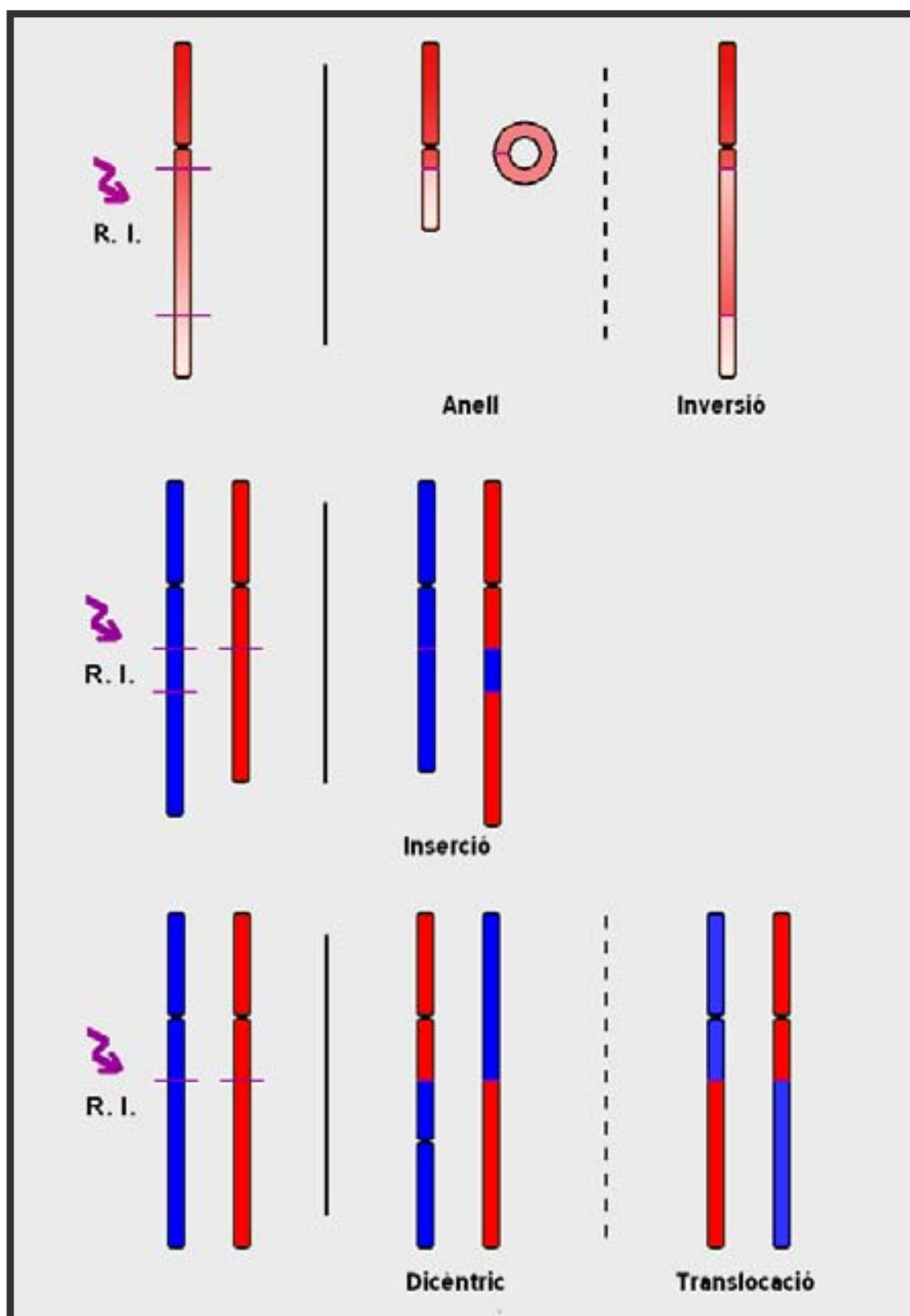


Figura 5.- Formació de les principals anomalies cromosòmiques. Les ratlles liles indiquen els punts de trencament.

### 1.3. Dosimetria biològica

Entre les metodologies desenvolupades per estimar la dosi d'una exposició a radiacions ionitzants hi ha la dosimetria biològica, dins d'aquesta la més usada és l'anàlisi de les alteracions cromosòmiques radioinduides. La dosimetria biològica estima la dosi d'una exposició a radiacions ionitzants a partir de la freqüència d'una determinada alteració cromosòmica, extrapolant-la a una corba dosi-efecte prèviament elaborada (IAEA 2001).

Clàssicament els estudis de dosimetria biològica s'han basat en l'anàlisi de la freqüència de cromosomes dicèntrics tenyits uniformement presents en metafases de limfòcits en primera divisió mitòtica. No obstant, i com veurem a continuació, l'aplicació de les tècniques de Hibridació *In Situ* Fluorescent (FISH), concretament el pintat cromosòmic, també s'ha mostrat útil per a realitzar dosimetria biològica (Edwards 2000).

#### 1.3.1. Metodologies utilitzades

##### *Tinció Uniforme*

Els cromosomes dicèntrics, acompanyats dels seus fragments acèntrics corresponents, són alteracions fàcilment identificables amb tinció uniforme i s'han utilitzat àmpliament en dosimetria biològica, ja que la seva freqüència basal és molt baixa (1 o 2 per 1000 cèl·lules) i mostren una bona relació amb la dosi. Malgrat que els cromosomes en anell també es detecten fàcilment, la seva freqüència és molt menor, unes 20 vegades inferior a la freqüència dels dicèntrics (Lloyd and Purrott 1981).

Degut a les propietats descrites, l'anàlisi de la freqüència dels dicèntrics es considera la millor metodologia per a estimar dosis recents i agudes (IAEA 2001). No obstant, la freqüència de dicèntrics disminueix ràpidament amb el temps post-irradiació, el que representa una limitació en estudis retrospectius.

## FISH

### *Pintat cromosòmic*

La tècnica de FISH consisteix en hibridar una porció del cariotip humà (per exemple, un cromosoma o més de un), amb sondes de DNA complementaries marcades amb fluorocroms. Aquesta metodologia permet localitzar les regions on s'han hibridat les sondes, i observar si estan implicades en reorganitzacions cromosòmiques.

En relació a la seva utilitat en dosimetria biològica, la introducció de les tècniques de pintat cromosòmic mitjançant FISH, permet detectar els cromosomes dicèntrics o en anell, alteracions visibles amb tinció uniforme, així com les translocacions i insercions que passaven majoritàriament desapercbudes. L'avantatge de poder d'analitzar translocacions és que es considera que la seva freqüència és més estable en el temps que la dels dicèntrics, i per tant el seu anàlisi es pot utilitzar per fer estudis retrospectius. Les insercions es donen amb una freqüència molt menor que les translocacions.

#### 1.3.2. Corbes dosi-efecte

Segons la IAEA (IAEA 2001), per a elaborar una corba dosi-efecte fiable per estudis de dosimetria biològica, cal analitzar la freqüència d'alteracions cromosòmiques en un mínim de 10 dosis diferents, i que a les dosis més elevades es comptabilitzi un mínim de 100 alteracions. A dosis baixes, on és difícil observar moltes alteracions, cal que el nombre de cèl·lules analitzades sigui prou elevat com per donar potència estadística a la corba.

Les corbes dosi-efecte per alteracions cromosòmiques que necessiten dos trencaments, com translocacions o dicèntrics, poden ser descrites adequadament per una funció linear-quadràtica, que s'expressa amb la següent equació (Lea and Catchside 1942):

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \quad \text{eq 3}$$

On  $Y$  és el nombre d'alteracions cromosòmiques per cèl·lula,  $C$  és la freqüència basal de l'alteració,  $D$  és la dosi, i  $\alpha$  i  $\beta$  són respectivament els coeficients lineal i quadràtic obtinguts de l'anàlisi estadístic.

L'equació linear quadràtica pronostica que la freqüència d'una alteració cromosòmica tipus intercanvi després d'una exposició a radiacions de baixa LET, és la suma de les alteracions cromosòmiques induïdes per un feix de radiació, el terme lineal, o dos feixos, el terme quadràtic de la corba. A dosis molt baixes els dicèntrics observats s'originen principalment per successos únics i, per tant predomina el primer terme. Per contra, a dosis altes la possibilitat d'interacció entre dos successos augmenta i per tant el terme quadràtic guanya rellevància.

Cal assenyalar que per radiacions d'alta LET, el terme quadràtic tendeix a desaparèixer, i la corba s'ajusta millor a un model lineal. Això s'explica perquè un sol feix es capaç de produir molts trencaments:

$$Y = C + \alpha D \qquad \text{eq 4}$$

Per saber si una irradiació ha estat homogènia cal comprovar si la distribució de cèl·lules amb dicèntrics segueix una Poisson. Desviacions d'aquesta distribució són un bon indicador d'exposicions no uniformes, com per exemple en els casos d'exposicions parcials, és a dir quan sols s'irradia una part del cos.

#### 1.4. Irradiacions parcials

En molts casos d'accidents o sobreexposicions a radiacions ionitzants, la irradiació rebuda no afecta la totalitat del cos sinó una part d'aquest. En aquests casos, estem davant d'una irradiació parcial i l'extrapolació directa de la freqüència d'alteracions observada a la corba dona una estimació inferior de la dosi rebuda per la part irradiada. Això és degut a que la porció de sang que ha estat irradiada s'analitza conjuntament amb sang no irradiada.

Utilitzant l'anàlisi de dicèntrics en metafases tenyides uniformement, quan no és coneix si una exposició afecta o no la totalitat del cos, una manera



d'esbrinar-ho és comprovar si la distribució de cèl·lules amb aberracions segueix una distribució de Poisson. En casos d'irradiacions parcials s'han descrit dos mètodes matemàtics per estimar la dosi rebuda per la part irradiada (IAEA 2001), que es basen en considerar les aberracions observades en les cèl·lules danyades. El primer mètode, proposat per (Dolphin 1969) i anomenat "mètode de la Poisson contaminada", assumeix que hi ha dues distribucions de Poisson en la distribució de cèl·lules amb dicèntrics, una que prové de les cèl·lules irradiades i l'altre de les no irradiades. Donada la baixa freqüència basal de dicèntrics, en una irradiació parcial es pot considerar que en el primer terme de la distribució de Poisson ( $e^{-\lambda}$ ), que correspon a les cèl·lules sense dicèntrics, hi ha una contaminació per cèl·lules no irradiades. La contaminació pot ser detectada com una desviació de la unitat normalitzada ( $u$ ) de l'índex de dispersió ( $\text{var}/y$ ). Usant el mètode de Poisson contaminada es pot estimar la fracció de cèl·lules analitzades que han estat irradiades i per tant la fracció originalment exposada. Un cop estimada la freqüència de dicèntrics en la fracció exposada, l'extrapolació a la corba dosi-efecte ens permet determinar la dosi rebuda per la fracció irradiada.

El segon mètode, anomenat  $Q_{dr}$  (Sasaki and Miyata 1968), només considera la taxa dels dicèntrics i anells de les cèl·lules que contenen alteracions i assumeix que aquestes alteracions són producte de l'exposició a les radiacions ionitzants. Una avantatge que ofereix aquest mètode és que no cal que hi hagi gaire cèl·lules amb més de dues alteracions. La fracció irradiada és calcula usant la metodologia anteriorment descrita per Dolphin.

### 1.5. Persistència de les diferents alteracions cromosòmiques

Quan l'anàlisi d'una exposició es fa de forma retrospectiva, un factor important que cal considerar és quin tipus d'alteració cromosòmica induïda s'analitza. Això, és important perquè la freqüència dels diferents tipus d'alteracions cromosòmiques no varia de la mateixa forma amb el temps post-exposició.

S'ha demostrat que els dicèntrics són una alteració cromosòmica inestable i que la seva freqüència disminueix amb el temps post-irradiació (Awa *et al.*

1978, Buckton *et al.* 1978, Bauchinger *et al.* 1989, Lindholm *et al.* 1998, Edwards *et al.* 2005). Això fa que el seu ús en estudis de dosimetria retrospectiva no sigui el més recomanat. Les translocacions, en canvi, es consideren generalment com a alteracions cromosòmiques més estables (Lucas *et al.* 1992, Salassidis *et al.* 1995, Hande *et al.* 1996, Lucas *et al.* 1996, Stephan and Pressl 1997, Guerrero-Carbajal *et al.* 1998, Lloyd *et al.* 1998, Gregoire *et al.* 2006) i per tant semblen més útils per a realitzar estudis retrospectius. Malgrat aquesta consideració general, s'ha descrit una disminució amb el temps en la freqüència de les translocacions després d'irradiacions a dosis altes (Camparoto *et al.* 2003). Un factor que contribueix a aquest descens és la co-ocurrència de translocacions i aberracions inestables en un mateixa cèl·lula (Matsumoto *et al.* 1998, Tawn and Whitehouse 2003, Rodriguez *et al.* 2004). En aquest sentit, s'ha demostrat que en casos d'exposicions parcials, la distribució de les translocacions en els cèl·lules no és independent de la de dicèntrics, i que per tant la pèrdua de cèl·lules amb dicèntrics provoca també una disminució de les cèl·lules amb translocacions i per tant de la freqüència d'aquestes anomalies (Guerrero-Carbajal *et al.* 1998). El panorama es torna encara més complex en realitat doncs les tècniques de FISH, permeten diferenciar entre translocacions incompletes (aquelles en que algun fragment pintat no s'ha reorganitzat amb la part del genoma contratenyida) i completes (aquelles on tota la part pintada s'ha reorganitzat). Les translocacions completes són les més estables en el temps (Spruill *et al.* 1996, Lindholm *et al.* 1998, Gregoire *et al.* 2006, Pala *et al.* 2001).

Altres alteracions cromosòmiques com anells o cromosomes acèntrics també mostren una clara disminució de la seva freqüència amb el temps post-irradiació. El mateix s'observa per la majoria de les alteracions complexes (alteracions provinents de tres trencaments i que afecten a un mínim de dos cromosomes) ja que habitualment contenen alteracions inestables (Edwards *et al.* 2005). Les insercions serien alteracions estables al llarg del temps però no són alteracions indicades per realitzar dosimetria biològica, sobretot perquè s'indueixen a una freqüència molt baixa.

## 2. HIPÒTESI



Les tècniques de FISH són útils per a realitzar dosimetria biològica en casos d'exposicions parcials i en estudis retrospectius, així mateix possibiliten una millor comprensió de la formació de les alteracions cromosòmiques radioinduides.

## *Hipòtesi*

## **3. OBJECTIUS**





Els objectius proposats es centren en dos aspectes crucials de la utilització de les tècniques de hibridació *in situ* fluorescent per a l'estudi de les alteracions cromosòmiques radioinduídes i per la dosimetria biològica.

### 3.1. Exposicions parcials

1. Determinar la utilitat de les tècniques de pintat cromosòmic en la detecció d'exposicions parcials a radiacions ionitzants de baixa LET.
2. Determinar la utilitat de les tècniques de pintat cromosòmic en l'estimació de la dosi rebuda per la part irradiada.

### 3.2. Anàlisis retrospectius

1. Determinar la variació de la freqüència dels diferents tipus d'alteracions cromosòmiques radioinduídes amb el temps post-irradiació, i comprovar el seu efecte en la determinació de la dosi d'exposició en casos d'anàlisis retrospectius.
2. Determinar la implicació cromosòmica en les alteracions radioinduídes i si existeix selecció d'alguna alteració cromosòmica amb el temps post-irradiació.



## 4. MATERIAL I MÈTODES



El material utilitzat ha estat:

- Limfòcits de sang perifèrica per l'estudi de dosimetria biològica en casos d'irradiacions parcials
- La línia cel·lular Jurkat per l'estudi de la persistència en el temps de les alteracions cromosòmiques radioinduídes.

#### 4.1. Obtenció de les mostres

##### Sang perifèrica

S'han extret mostres de sang perifèrica d'un donant voluntari sa de 32 anys i sense historial d'exposició a agents clastogènics, el qual, prèviament a les extraccions, va donar el consentiment informat per a realitzar l'estudi. Les mostres s'han obtingut mitjançant venipunció arterocubial amb una xeringa prèviament heparinitzada amb heparina sòdica a l'1%.

##### Línia cel·lular Jurkat

La línia cel·lular Jurkat, obtinguda de l'ATCC (American Type Culture Collection), és una línia cel·lular de cèl·lules T derivada d'una leucèmia limfoblàstica de cèl·lules T humana.

#### 4.2. Condicions d'irradiació

Les condicions d'irradiació han estat les mateixes tant per les mostres de sang perifèrica com per la línia cel·lular Jurkat. S'ha utilitzat una font de raigs X, amb una qualitat del feix que correspon a un valor de la capa hemireductora de 1,43 mm Cu (180 kV, 9 mA i 0,5 mm Cu filtració). La taxa de dosi ha estat de 0,27 Gy/min. Durant les irradiacions s'han seguit les recomanacions de la IAEA (2001).

Per a la determinació de les dosis d'irradiacions s'ha realitzat un calibratge previ de la unitat de raigs X utilitzant un electròmetre (Farmer-2570) amb una càmera d'ionització, model 2571, de 0,63cm<sup>3</sup>. La determinació de la dosi, així com el calibratge i control periòdic de l'equip de raigs X, l'ha fet el Servei de

Radiofísica i Radioprotecció de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

En l'estudi on es simulen les exposicions parcials, les mostres de sang perifèrica van ser irradiades a 2, 3, 4 i 5 Gy. Un cop irradiada la sang, es va barrejar amb sang no irradiada (veure 2.3.1.).

Les cèl·lules de la línia Jurkat van ser irradiades en  $G_0$  a les dosis de 0,2, 2 i 4 Gy. Per sincronitzar el cultiu a fase  $G_0$ , les cèl·lules van ser cultivades sense sèrum les 24h anteriors a la seva congelació (Merrill 1998). Dues hores abans de la irradiació es van descongelar les cèl·lules i es van posar a cultivar en medi complet a 37°C.

### 4.3. Condicions de cultiu

#### 4.3.1. Sang perifèrica

Per a simular exposicions parcials, la sang irradiada de cadascuna de les dosis es va barrejar amb sang no irradiada per tal d'obtenir els següents percentatges de sang irradiada: 100%, 87,5%, 75%, 50%, 25%, 12,5% i 0%.

En tots els casos, 0,8 ml de la barreja de sang es van cultivar 48h en 5 ml de medi RPMI 1640 complementat amb sèrum fetal boví (20%), L-glutamina 10x (2%) (Gibco), un 1,5% de penicil·lina/estreptomicina (10000 UI/ml) , un 5% de fitohemaglutinina [2,5 µg/ml] (Gibco), un 5% de heparina sòdica [10mg/ml] (Rovi) al 1% i 5-Bromo 2'deoxiuridina (BrdU) (12µg/ml)(Sigma-Aldrich). Per tal d'aturar la divisió cel·lular en metafase, es va afegir 150µl de colcemid (10µg/ml) (Gibco) 2 hores abans de l'extracció del cultiu. La extracció del cultiu es va fer mitjançant tractament hipotònic (KCl 0,075M) (Merck) i fixacions i rentats amb Carnoy (Metanol: àcid acètic, 3:1) (Merck). La presència de BrdU va permetre l'anàlisi de les metafases de primera divisió mitòtica.

Les suspensions fixades amb Carnoy es van guardar a la nevera fins el moment del seu ús.

### 4.3.2. Línia cel·lular Jurkat

Les cèl·lules Jurkat creixen en suspensió i s'han cultivat a 37°C en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%, en medi RPMI 1640 (Gibco) complementat amb un 15% de sèrum boví fetal, un 0,5% de L-Glutamina 10x i un 1% de penicil·lina/estreptomicina (10000 UI/ml) (Gibco). Les cèl·lules Jurkat mostren un creixement formant agregats cel·lulars, i les extraccions de part del cultiu per a l'estudi citogenètic s'han fet quan els agregats cel·lulars eren prou grans. Per a procedir a l'extracció el cultiu s'ha dividit en dos parts iguals, una meitat s'ha continuat cultivant i l'altra s'ha utilitzat per fer l'anàlisi citogenètica. En cada extracció, es van fer recomptes cel·lulars per a determinar el número de duplicacions de la població cel·lular, que es van calcular amb la següent fórmula (eq1):

$$\text{Número de duplicacions} = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = 3.32 \log \left( \frac{N}{N_0} \right) \quad eq5$$

on N és el número final de cèl·lules y N<sub>0</sub> el número inicial.

## 4.4. Tècniques de tinció cromosòmica

### 4.4.1. Pintat dels cromosomes 1, 4 i 11 mitjançant tècniques d'hibridació "in situ" fluorescent (FISH)

La FISH es va realitzar amb sondes que hibriden amb la totalitat dels cromosomes 1, 4 i 11 marcades amb carbocianina 3 (Cy3) (Cambio). A més s'ha utilitzat una sonda pancentromèrica marcada amb isotiocianat de fluoresceïna (FITC) (Cambio). Al llarg de l'experimentació és va canviar el protocol de FISH utilitzat, inicialment es feia una hibridació clàssica i més endavant es va optimitzar utilitzant un protocol on no calia utilitzar formamida.

#### 4.4.1.1. Hibridació clàssica

Per tal d'hibridar una superfície de 30x22mm, es van preparar dos tipus de sondes per separat, cromosòmica i pancentromèrica.

Sonda cromosòmica: en un eppendorf es van barrejar 1µl de cadascuna de les sondes cromosòmiques amb 12µl de solució tampó, les sondes es van desnaturalitzar 2min a 72°C i es van incubar 60 min a 37°C.

Sonda pancentromèrica: es van posar 10µl de la sonda pancentromèrica, ja tamponada, en un eppendorf i es va desnaturalitzar 8 min a 72°C. Un cop desnaturalitzada, la sonda es va posar en gel fins el moment de la seva utilització. Aquest procés va començar quan el portaobjectes es desnaturalitzava amb formamida al 70%.

El portaobjectes on s'han fet les extensions cromosòmiques es van deshidratar en una sèrie d'etanols (70, 85 i 100%) (Merck), 2 min cadascuna, i es van deixar assecar a l'aire. Després, els portaobjectes es desnaturalitzaven 2 min en una solució al 70% de formamida (Panreac)/2xSSC (pH=7) a 72°C, i immediatament després es van passar per una sèrie d'etanols freds (70, 85 i 100%) 2 min en cadascun, i es van deixar assecar a l'aire.

La solució pancentromèrica es va barrejar amb la solució de sondes cromosòmiques, i es van posar 25µl de la barreja sobre el portaobjectes, es va cobrir amb el cobreobjectes i es va segellar amb cola, es va incubar a 42°C durant una nit en cambra humida.

L'endemà es va treure la cola, i el cobreobjectes submergint el portaobjectes durant un minut en una solució de 2xSSC, a temperatura ambient. Es van rentar 3 min a 42°C en cadascuna de les següents solucions: 50% Formamida/2xSSC, 0,1xSSC i dues vegades en 4xSSC/0,05%Tween20, abans que s'assequés completament, es van aplicar 20µl de 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)/antifade (Vysis) per a contratenyir. Es va col·locar un cobreobjectes i es va guardar en fosc a la nevera fins el moment de ser analitzat.

#### 4.4.1.2. Hibridació optimitzada

Per tal d'evitar l'ús de formamida es va posar també a punt el següent protocol que es va aplicar en l'estudi realitzat amb cèl·lules Jurkat.



Es va deshidratar el portaobjectes on hi ha les extensions cromosòmiques en una sèrie d'etanols (70, 85 i 100%), 2 min en cadascuna, i es va deixar assecar a l'aire. Es van barrejar 1µl de sonda cromosòmica de cada un dels cromosomes (1, 4 i 11) 12µl de solució tampó i 10µl de sonda pancentromèrica, i es va col·locar la barreja sobre el portaobjectes, posant-lo tot seguit en la placa de hibridació Vysis HYBrite. A la placa, les extensions cromosòmiques i les sondes cromosòmiques es desnaturalitzen conjuntament a 69°C durant 3 minuts i s'hibriden a 40°C durant 24h. Després es realitzen rentats de cinc minuts, en les següents solucions: 1xSSC a 73°C, 2xSSC/0,01%Tween20 i 4xSSC/0,05%Tween20 a temperatura ambient. Finalment es va fer la contratació amb 20µl de DAPI.

#### 4.4.2. mFISH (multiplex Fluorescent *In Situ* Hibridization)

La tècnica de mFISH consisteix a pintar cada parell de cromosomes d'una metafase amb una combinació específica de sondes marcades com a màxim amb 3 fluorocroms. El kit comercial de Spectra Vision™ (Vysis) utilitza 5 fluorocroms: Spectrum Gold, Spectrum Aqua, Spectrum Far-red, Spectrum Red i Spectrum Green. Un cop capturades les imatges per a cada fluorocrom el programa Genus (Applied Imaging) assigna un color fals a cada combinació de colors (Figura 6).

| Cromosoma  | 1      | 2     | 3    | 4       | 5      | 6           | 7       | 8          | 9           | 10         | 11          | 12         | 13          | 14          | 15          | 16         | 17          | 18         | 19          | 20         | 21          | 22         | X           | Y          |
|------------|--------|-------|------|---------|--------|-------------|---------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| Gold       | Yellow |       |      |         | Yellow |             |         |            | Yellow      | Yellow     |             | Yellow     |             | Yellow      | Yellow      |            |             |            | Yellow      |            | Yellow      |            |             | Yellow     |
| Aqua       |        |       | Blue |         |        |             |         |            |             | Blue       | Blue        |            | Blue        |             | Blue        |            |             |            |             | Blue       | Blue        | Blue       | Blue        | Blue       |
| Far Red    |        |       |      | Magenta |        |             | Magenta | Magenta    |             | Magenta    |             |            |             |             | Magenta     | Magenta    | Magenta     | Magenta    |             | Magenta    |             |            | Magenta     |            |
| Red        |        | Red   |      | Red     |        |             |         | Red        | Red         |            | Red         |            |             | Red         | Red         |            | Red         | Red        |             | Red        |             | Red        |             | Red        |
| Green      |        |       |      | Green   |        | Green       |         |            |             |            |             | Green      | Green       |             |             | Green      | Green       |            | Green       |            | Green       | Green      |             | Green      |
| Combinació | Yellow | Red   | Blue | Orange  | Pink   | Light Green | Purple  | Light Blue | Light Green | Light Blue | Light Green | Light Blue | Light Green | Light Blue  | Light Green | Light Blue | Light Green | Light Blue | Light Green | Light Blue | Light Green | Light Blue | Light Green | Light Blue |
| Color fals | Red    | Green | Blue | Yellow  | Cyan   | Magenta     | Brown   | Dark Green | Dark Blue   | Olive      | Teal        | Purple     | Pink        | Light Green | Light Blue  | Yellow     | Light Green | Pink       | Brown       | Green      | Blue        | Olive      | Teal        | Purple     |

Figura 6. Graella dels fluorocroms de les sondes de cada cromosoma, color resultant d'aquesta combinació i color fals utilitzat per a l'anàlisi.

Abans de realitzar la hibridació es va fer un pretractament del portaobjectes:

- Per tal d'eliminar restes cel·lulars del portaobjectes que podrien interferir en la hibridació es van realitzar dos tractaments enzimàtics a 37°C, un de 15 minuts amb 20µl de RNasa A (100µg/ml) (Sigma-Aldrich) i un altre amb 25µl de pepsina (Sigma-Aldrich) a una concentració final de (500µg/ml) durant 10 minuts.

- Es va realitzar una post-fixació de 10 min a temperatura ambient en 1% de formaldehid en PBS/50 mM MgCl<sub>2</sub>, i dos rentats de 5 min en PBS a temperatura ambient.
- Es va deshidratar la mostra en una sèrie d'etanols (70, 85 i 100%; 2 min cadascun), i es va deixar assecar al aire.

Per la hibridació es van seguir els passos següents:

- Es va desnaturalitzar la mostra durant 2 min en 70% (v/v) formamida/2XSSC a 72°C. Després es va deshidratar en una sèrie d'etanols (70, 85 i 100%; 2 min cadascun), i es va deixar assecar al aire.
- El còctel de sondes dels cromosomes es va desnaturalitzar a 72°C durant 5 min.
- Es va aplicar la sonda cromosòmica a la regió d'interès del portaobjectes, es va cobrir amb un cobreobjectes i es va segellar amb cola.
- Es va deixar hibridant 12-24h en cambra humida a 45°C.
- Es va rentar la preparació 2 min en 0,4xSSC/0,3% NP40 (Vysis) a 73°C, i 2 min en 2xSSC/0,1% NP40 a temperatura ambient.
- Es va deshidratar el portaobjectes en una sèrie de etanols i un cop sec se li va aplicar 20µl de contratinció (DAPI/antifade).

## **4.5. Criteri d'anàlisi i nomenclatura utilitzada**

### **4.5.1. Pintat cromosòmic**

L'anàlisi al microscopi s'ha fet utilitzant un filtre de triple banda (Cy3, FITC i DAPI), i a més usant els filtres específics per Cy3, FITC i DAPI.

Durant l'anàlisi, cada metafase amb anomalies cromosòmiques va ser descrita utilitzant una modificació (Knehr *et al.* 1998) de la nomenclatura PAINT (Tucker 1995). Segons aquesta modificació, cada metafase es considera com a una unitat per tenir en compte els mecanismes de formació de les aberracions.

El sistema per descriure les alteracions utilitza un codi alfabètic on la lletra “A/a” fa referència a la part contratenyida i la lletra “B/b” a la part hibridada. Les lletres en majúscula indiquen la presència de centròmer i en minúscula la seva absència. Aquest codi va precedit per les abreviatures de les diferents alteracions cromosòmiques descrites per la ISCN (ISCN 2009), per exemple: dic(BA) ace(ab) indica un fragment dicèntric bicolorejat acompanyat d'un fragment acèntric bicolorejat; t(Ab) t(Ba) és una translocació recíproca bicolorejada (Figura 7).

Una alteració cromosòmica es considera com a completa quan totes les parts del cromosoma pintat estan reorganitzades, i com a incompleta quan una o més parts no estan reorganitzades (Figura 7).

La nomenclatura “PAINT modificada” permet a més classificar les alteracions en simples o complexes (Figura 7). En alteracions tipus intercanvi, les simples són les alteracions que es poden explicar amb dos trencaments, mentre que les complexes necessiten més de dos trencaments en dos o més cromosomes (Savage and Simpson 1994). Quan s'aplica la tècnica de pintat cromosòmic, les anomalies simples, generalment s'anomenen aparentment simples, doncs existeix la possibilitat que provinquin d'alteracions complexes, que amb el pintat cromosòmic es visualitzen com a simples. Quan s'aplica la tècnica de mFISH aquestes limitacions desapareixen (Figura 8).

Finalment, les alteracions cromosòmiques també es van descriure segons la nomenclatura convencional segons fossin translocacions (t), dicèntrics (dic), anells (r), acèntrics (ace), insercions (ins).

Per tal de poder tractar totes les dades, aquestes s'han introduït en fulls *excel*, que a partir de la descripció de les alteracions d'una metafase utilitzant la nomenclatura PAINT, es converteixen automàticament a nomenclatura PAINT modificada i nomenclatura convencional. Gràcies a això, es poden obtenir de forma automàtica la freqüència i les distribucions per cèl·lula de cada tipus d'alteració.

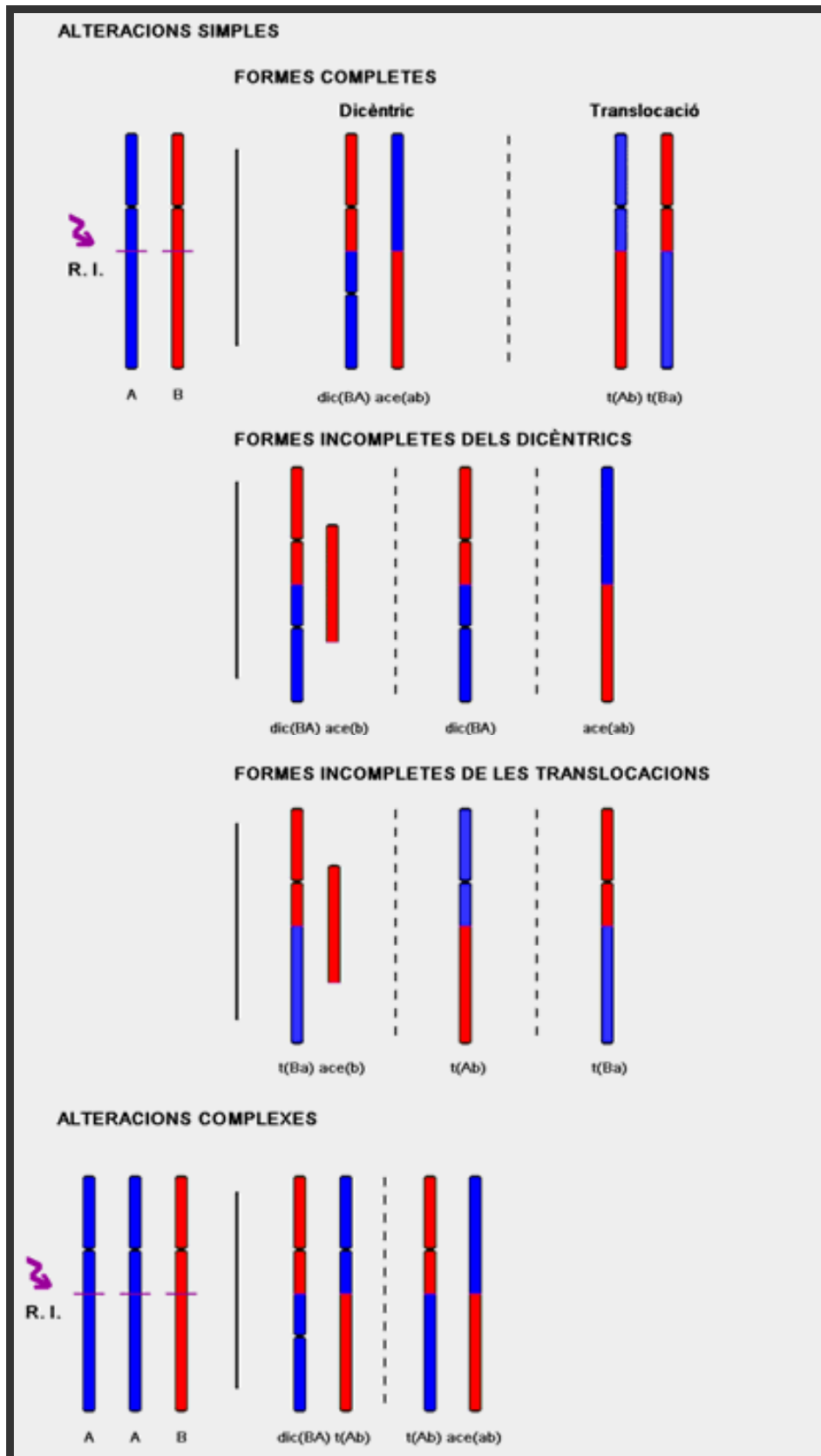


Figura 7. Esquema de dicèntrics i translocacions amb les seves variants incompletes i d'alteracions complexes. Les alteracions es descriuen segons la nomenclatura PAINT modificada.

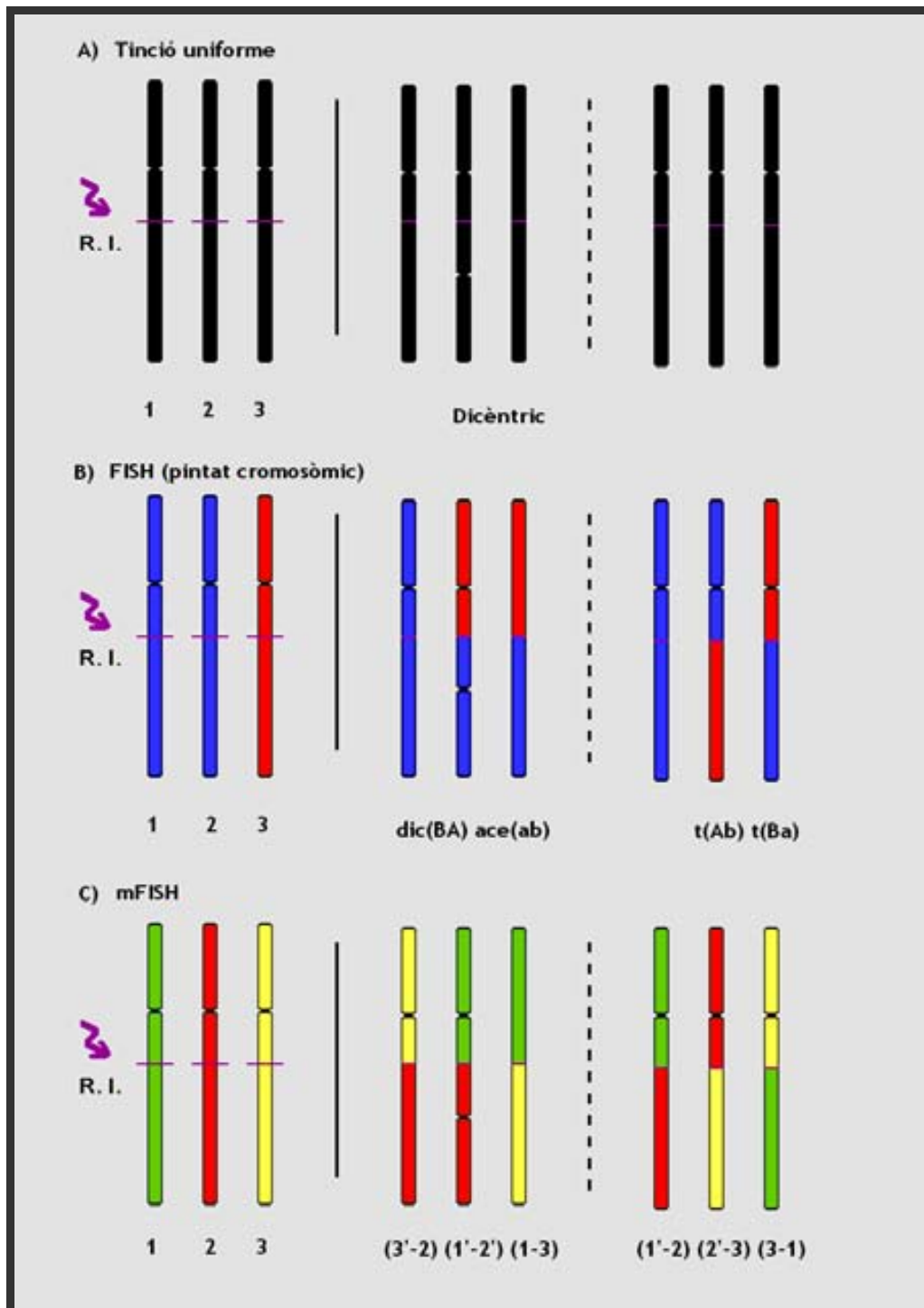


Figura 8. Exemple de com s'observaria una alteració cromosòmica en funció de la tècnica que s'apliqui. (I) en el cas d'un dicèntric (II) en el cas d'una translocació. En A s'observaria un dicèntric i un acèntric en la situació (I). En B s'observaria un dicèntric i un acèntric en la situació (I) i una translocació recíproca en la situació (II). En C s'observarien dos tipus d'alteració complexa.

Exemples d'alteracions aparentment simples completes es poden veure a les figures 9 i 10. Les alteracions aparentment simples incompletes i completes, s'han agrupat com a translocacions aparentment simples (AST) i com a dicèntrics aparentment simples (ASD). Les translocacions totals ( $t_t$ ) i els dicèntrics totals ( $dic_t$ ), inclouen les AST i les ASD més aquelles provinents de les alteracions complexes. A la figura 11 es pot veure un exemple d'alteració aparentment simple incompleta i a la figura 12 una alteració complexa.

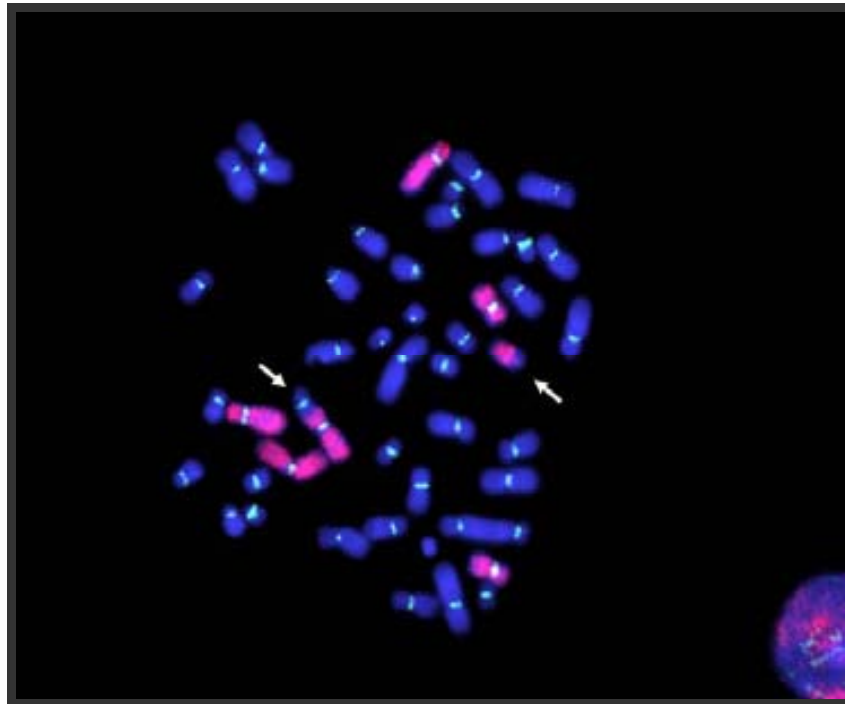


Figura 9. Imatge d'una metafase amb un  $dic(BA) ace(ab)$ .

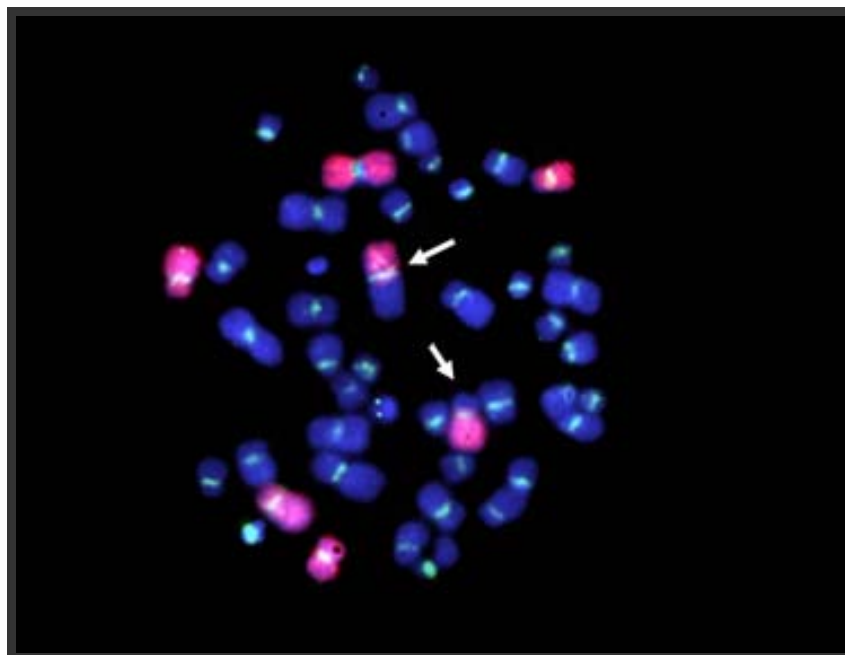


Figura 10. Imatge d'una metafase amb una  $t(Ba) t(Ab)$ .

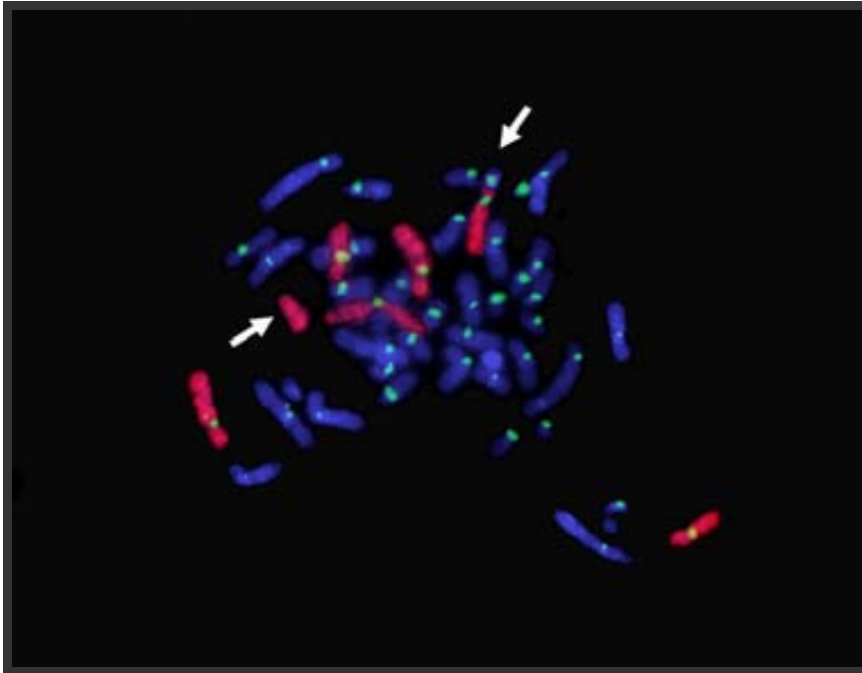


Figura 11. Imatge d'una metafase amb un *dic(BA) ace(b)*.

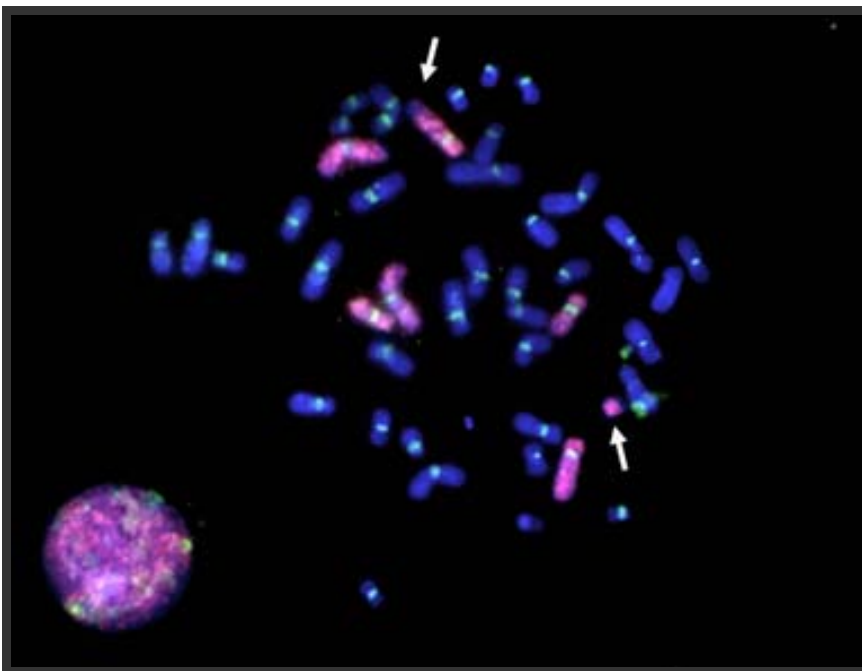


Figura 12. Imatge d'una metafase amb una alteració complexa *t(Ba) ace(ab)*.

#### 4.5.2. mFISH

Les metafases s'han localitzat amb el filtre DAPI, i les imatges de l'emissió dels diferents fluorocroms s'han capturat usant els filtres Gold, Aqua, Fred, Red i Green i DAPI (Figura 13). L'anàlisi s'ha fet en les imatges digitalitzades obtingudes amb el sistema de captura i d'anàlisi CytoVision 2.7 (Applied Imaging Corporation.USA).

Les alteracions detectades s'han descrit seguint la nomenclatura mPAINT (Cornforth 2001), que descriu els elements alterats, posant entre parèntesis i separant amb un guió cada un dels segments, anomenant-los pel número o lletra de cada cromosoma. Quan un segment conté el centròmer, s'afegeix un apòstrof al cromosoma, de manera que de forma intuïtiva es pot diferenciar una translocació d'un dicentric. Quan darrera del apòstrof hi ha una lletra T majúscula, indica que el cromosoma s'ha trencat i li falta un fragment, quan es vol descriure un anell s'afegeix una r minúscula davant del parèntesi. A la figura 14 es pot veure un esquema d'alteració complexa amb mFISH, descrita amb nomenclatura mPAINT. A la figura 15 es pot observar una metafase amb una alteració complexa.

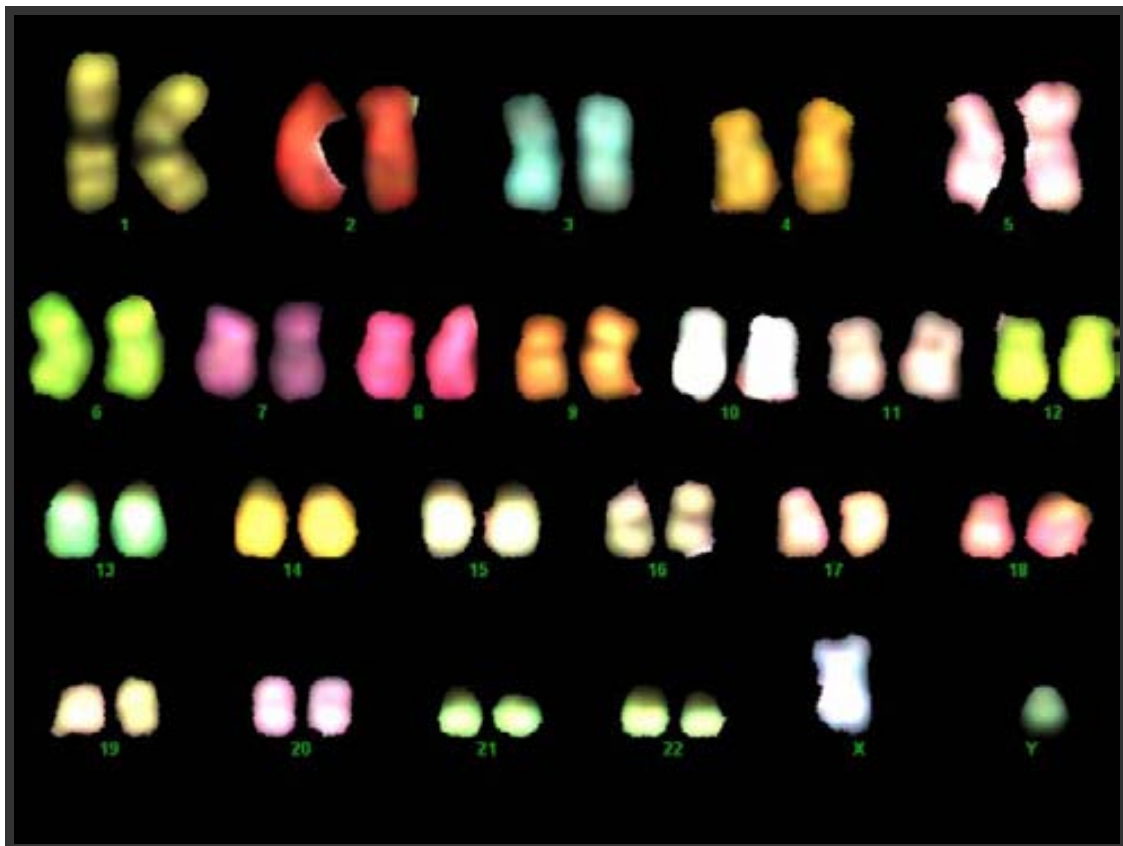


Figura 13. Metafase d'una cèl·lula Jurkat, amb mFISH, que no presenta cap alteració cromosòmica estructural.



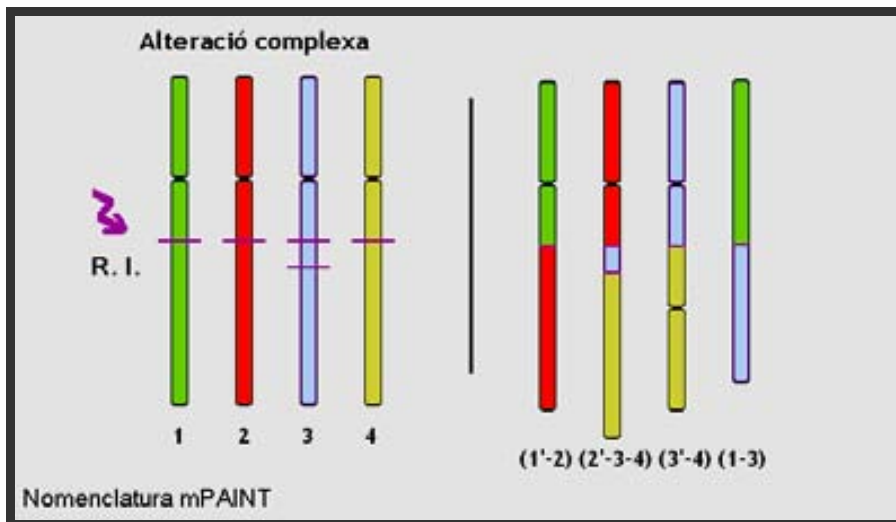


Figura 14. Exemple d'alteració complexa descrita segons la nomenclatura mPAINT.

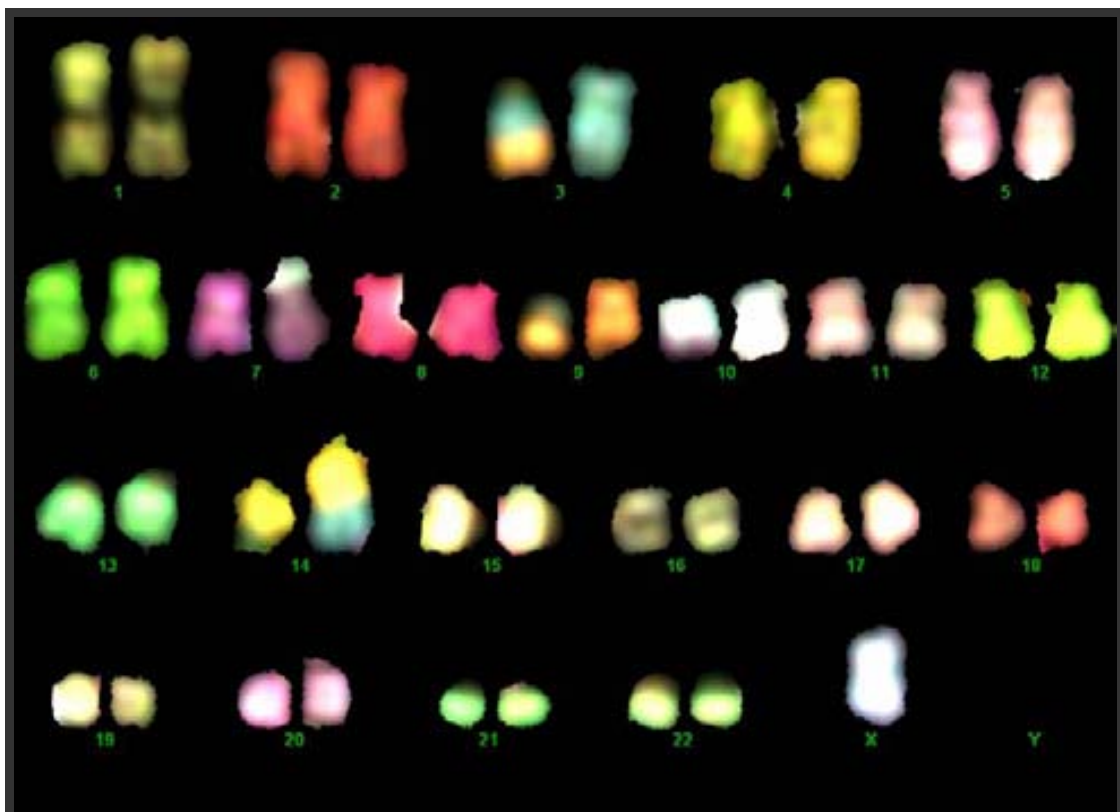


Figura 15. Metafase d'una cèl·lula Jurkat, amb mFISH, que presenta les següents alteracions: (3'-9) (3-14) (9'-3) (7'-10') (7-10) i a la qual li manca el cromosoma Y.

Les alteracions tipus no-intercanvi s'han classificat com a:

- Delecions terminals vertaderes (TTD), formades per un cromosoma cèntric truncat acompanyat pel fragment acèntric corresponent.
- Cromosoma truncat aïllat (LTChr), quan el cromosoma està truncat però no hi ha associat cap fragment acèntric.
- Fragment acèntric aïllat (LLAF), quan un fragment acèntric no té aparentment associat cap cromosoma cèntric truncat.

Les alteracions tipus intercanvi es classifiquen com a simples o complexes. Els intercanvis simples es classifiquen com a *complets* quan totes les peces estan reorganitzades, com a *incomplets* quan totes les peces són visibles però no totes estan reorganitzades, i com a *one-way* quan una peça no és visible. Els intercanvis complexes es classifiquen usant el sistema C/A/B (Chromosomes/Arms/Breaks) (Savage and Simpson 1994). Davant d'una alteració complexa s'ha de determinar quins cromosomes en formen part, és a dir quins cromosomes prèviament trencats per l'efecte de la radiació han convergit en un mateix punt i en un mateix moment (cicle estructural) per originar l'alteració cromosòmica complexa. Pot passar que una alteració complexa sigui producte de més d'un cicle estructural. Aquestes situacions s'anomenen intercanvis complexes seqüencials (SEC<sub>s</sub>). Els cicles estructurals es defineixen amb un número d'ordre, que correspon al nombre de trencaments necessari perquè es pugui formar l'anomalia cromosòmica. A cada SEC cal assignar-li l'estructura de cicle obligada més simple possible (Cornforth 2001, Loucas and Cornforth 2001).

## 4.6. Anàlisi estadística

### 4.6.1. Estudi d'irradiacions parcials

#### 4.6.1.1. Determinació de la parcialitat

Per saber si la distribució de cèl·lules amb les diferents anomalies cromosòmiques considerades segueix una distribució de Poisson, s'han

utilitzat 2 tests. El primer, s'anomena test  $u$  (eq 2) (Rao and Chakravarti 1956), que s'utilitza clàssicament en estudis de dosimetria biològica (Savage 1970, Edwards *et al.* 1979). Aquest test calcula la unitat normalitzada ( $u$ ) de l'índex de dispersió (DI) (variança/mitjana) que en una distribució de Poisson és 1. Els valors de  $u$  fora de l'interval  $\pm 1,96$  indiquen que una distribució no segueix una Poisson (nivell de significació  $p < 0,05$ ).

$$u = (DI - 1) \sqrt{\frac{N - 1}{2(1 - (1/X))}} \quad eq6$$

on  $N$  és el nombre de cèl·lules analitzades i  $X$  el nombre d'alteracions.

Després d'una irradiació parcial s'espera que entre les cèl·lules sense alteracions coexisteixen cèl·lules irradiades i no irradiades, el que afecta al primer terme de la distribució de Poisson. Per tant, en aquest tipus d'anàlisi és molt útil aplicar un test específic, com el test  $s$ . Aquest, deriva del model "Poisson inflada en el zero" (Bohning *et al.* 1998) on els valors de  $s$  es calculen amb l'equació 7. Amb aquest test, els valors de  $s$  fora de l'interval  $\pm 1,96$  indiquen que una distribució no segueix una Poisson (nivell de significació  $p < 0,05$ ).

$$s = \sqrt{N} \frac{\frac{n_0}{N} e^\lambda - 1}{\sqrt{e^\lambda - \lambda - 1}} \quad eq7$$

on  $N$  és el nombre de cèl·lules analitzades,  $n_0$  el nombre de cèl·lules sense aberracions i  $\lambda$  la freqüència d'aberracions.

La freqüència d'aberracions en la fracció irradiada ( $\lambda$ ) s'estima per iteració segons la equació 8 (Dolphin 1969). En aquesta equació,  $\lambda$  és la freqüència de l'aberració considerada en la fracció irradiada, i  $e^{-\lambda}$  representa les cèl·lules no danyades dins la fracció irradiada. Donada la baixa magnitud de  $\lambda$  en el nostre estudi, una bona aproximació de  $\lambda$  pot ser obtinguda resolent la equació 9. Aquesta solució és exacte fins als dos primers decimals quan  $(X/N - n_0) < 1,7$ .

$$\frac{\lambda}{1 - e^{-\lambda}} = \frac{X}{N - n_0} \quad eq8$$

$$\lambda = \sqrt{12 \left( \frac{X}{N - n_0} \right) - 3} - 3 \quad eq9$$

#### 4.6.1.2. Estimació de la dosi

A partir de la freqüència estimada d'alteracions en la fracció irradiada  $\lambda$ , i utilitzant les corbes dosi-efecte, es pot estimar la dosi d'aquesta fracció irradiada resolent la corba linear quadràtica (eq 3), d'on:

$$D = \frac{-\alpha + \sqrt{\alpha^2 + 4\beta(\lambda - C)}}{2\beta} \quad eq 10$$

Per calcular els intervals de confiança del 95% de les dosis estimades, s'utilitza el terme  $X/(N-n_0)$ , anomenat "freqüència de la Poisson truncada" i la seva variança (eq11).

$$\text{var} \left( \frac{X}{(N - n_0)} \right) = \text{var} [X/(N-n_0)] = X/[1 + \lambda - X/(N-n_0)]/(N-n_0)^2 \quad eq 11$$

La estimació de la dosi pels diferents tipus d'anomalies cromosòmiques s'ha fet usant les corbes dosi-efecte per a cada tipus d'alteració cromosòmica, establertes prèviament en el nostre laboratori (Barquinero *et al.* 1999).

#### 4.6.2. Estudi de la persistència de les alteracions al llarg del temps post-irradiació

En l'estudi a llarg termini realitzat amb la línia cel·lular Jurkat, s'han fet servir diversos tests estadístics.

Amb el test t d'estudent, s'han comparat les freqüències de les alteracions cromosòmiques.

S'ha usat el test khi-quadrat ( $\chi^2$ ) en l'anàlisi dels trencaments soferts per a cada un dels parells de cromosomes comparant la freqüència observada i la

frequència esperada segons dos models, un que té en compte el contingut de DNA de cada cromosoma (Morton 1991) i un altre que té en compte la superfície del territori de cada un dels cromosomes (Cigarran *et al.* 1998).

En l'apartat on s'analitza si hi ha associacions preferents de cromosomes alhora de formar alteracions cromosòmiques radio-induïdes, és varen combinar les dades de les mostres de 2 i 4 Gy. Prèviament, i per a determinar si això era possible, es va aplicar el test de Wilcoxon (signed ranks), que va indicar que no es tractava de dos poblacions diferents.

Una vegada combinades les dades es van analitzar les possibles associacions preferencials de cromosomes amb una aplicació web anomenada SCHIP (Statistics for CHromosome Interface Positioning) (Vives *et al.* 2005). Aquesta aplicació realitza simulacions Montecarlo, valorant si són significatives les desviacions respecte a la hipòtesi nul·la que considera que les associacions cromosoma-cromosoma es donen a l'atzar. A partir d'una graella que conté les associacions de totes les parelles de cromosomes i prenent com a base la hipòtesi nul·la, aquesta aplicació normalitza la quantitat de vegades que un cromosoma participa en els intercanvis cromosòmics i mostra la desviació respecte l'atzar de cada parell de cromosomes. Quan una associació entre dos cromosomes mostra una desviació important l'aplicació permet determinar si aquesta és significativa, mostrant un valor de p. A més, quan associacions de cromosomes amb p elevada tenen algun cromosoma en comú se'ls proposa com a possibles candidats a "clusters". L'aplicació informàtica permet en aquests casos determinar nous valors de p pel "cluster" cromosòmic candidat, el que ens indica si l'associació és significativa. Com que el test SCHIP fa comparacions múltiple a partir d'una mateixa matriu de dades, i no realitza cap correcció per anàlisi múltiple, cal corregir els resultats obtinguts mitjançant la false discovery rate (FDR). Aquesta correcció incrementa l'exigència alhora de considerar la significació.



## 5. RESULTATS





## 5.1. Irradiacions parcials

### 5.1.1. Resultats citogenètics

En les taules de la 1 a la 4, es mostren els resultats citogenètics de la simulació d'irradiacions parcials a les dosis de 2, 3, 4 i 5 Gy. En total s'han analitzat 18.950 cèl·lules on s'han detectat 2.806 alteracions cromosòmiques de les quals 310 han estat complexes.

Les alteracions més freqüentment induïdes han estat les translocacions i els dicèntrics aparentment simples, que mostren sempre una relació molt propera a 1. El percentatge d'alteracions simples incompletes respecte el total d'alteracions simples està entre un 20 i un 30% i no mostra variacions ni en funció de la dilució ni en funció de la dosi. Pel que fa a les anomalies complexes, la mitjana del percentatge, en relació al total d'anomalies, incrementa amb la dosi, 7,65 % a 2 Gy, 9,34 % a 3 Gy, 11,10 % a 4 Gy i 18,50 % a 5 Gy.

Taula 1. Resultats citogenètics per a cada dilució després de la irradiació a 2 Gy.

| Dosi(Gy)<br>dilució (%)         | 2    |      |      |      |       |
|---------------------------------|------|------|------|------|-------|
|                                 | 87,5 | 75   | 50   | 25   | 12,5  |
| Cèl·lules analitzades           | 974  | 1551 | 1322 | 1516 | 1322  |
| Cèl·lules amb alteracions       | 159  | 183  | 126  | 74   | 41    |
| Alteracions simples             |      |      |      |      |       |
| <i>t</i> (Ba) <i>t</i> (Ab)     | 51   | 62   | 46   | 22   | 10    |
| <i>t</i> (Ba) <i>ace</i> (b)    | 2    | 3    | 0    | 2    | 0     |
| <i>t</i> (Ab)                   | 10   | 7    | 0    | 1    | 4     |
| <i>t</i> (Ba)                   | 6    | 5    | 13   | 6    | 2     |
| % de incompletes                | 26,1 | 19,5 | 22,0 | 29,0 | 37,5  |
| AST                             | 69   | 77   | 59   | 31   | 16    |
| <i>dic</i> (BA) <i>ace</i> (ab) | 41   | 63   | 44   | 30   | 8     |
| <i>dic</i> (BA) <i>ace</i> (b)  | 2    | 5    | 3    | 1    | 1     |
| <i>ace</i> (ab)                 | 2    | 2    | 1    | 1    | 0     |
| <i>dic</i> (BA)                 | 20   | 15   | 7    | 3    | 5     |
| % de incompletes                | 36,9 | 25,9 | 20,0 | 14,3 | 42,9  |
| ASD                             | 65   | 85   | 55   | 35   | 14    |
| <i>r</i> (B) <i>ace</i> (b)     | 4    | 7    | 3    | 1    | 0     |
| <i>r</i> (b)                    | 0    | 2    | 0    | 0    | 0     |
| altres                          | 2    | 3    | 0    | 0    | 0     |
| Alteracions complexes           |      |      |      |      |       |
| <i>t</i> (Ba) <i>ace</i> (ab)   | 4    | 3    | 2    | 2    | 3     |
| <i>dic</i> (BA) <i>t</i> (Ab)   | 3    | 4    | 0    | 0    | 0     |
| altres                          | 4    | 5    | 2    | 3    | 2     |
| % de complexes                  | 7,28 | 6,45 | 3,31 | 6,94 | 14,29 |
| T.D.                            | 11   | 18   | 10   | 3    | 6     |

AST i ASD, total de translocacions aparentment simples i dicèntrics respectivament. T.D., delecions terminals.

Taula 2. Resultats citogenètics per a cada dilució després de la irradiació a 3 Gy.

| Dosi(Gy)<br>dilució (%)         | 3    |      |       |      |       |
|---------------------------------|------|------|-------|------|-------|
|                                 | 87,5 | 75   | 50    | 25   | 12,5  |
| Cèl·lules analitzades           | 849  | 824  | 1009  | 1070 | 1096  |
| Cèl·lules amb alteracions       | 232  | 165  | 152   | 57   | 59    |
| Alteracions simples             |      |      |       |      |       |
| <i>t</i> (Ba) <i>t</i> (Ab)     | 76   | 53   | 63    | 17   | 24    |
| <i>t</i> (Ba) <i>ace</i> (b)    | 2    | 0    | 1     | 2    | 0     |
| <i>t</i> (Ab)                   | 6    | 6    | 6     | 4    | 6     |
| <i>t</i> (Ba)                   | 22   | 11   | 6     | 3    | 2     |
| % de incompletes                | 28,3 | 24,3 | 17,1  | 34,6 | 25,0  |
| AST                             | 106  | 70   | 76    | 26   | 32    |
| <i>dic</i> (BA) <i>ace</i> (ab) | 91   | 57   | 50    | 22   | 19    |
| <i>dic</i> (BA) <i>ace</i> (b)  | 12   | 2    | 9     | 0    | 2     |
| <i>ace</i> (ab)                 | 1    | 5    | 3     | 2    | 1     |
| <i>dic</i> (BA)                 | 24   | 15   | 9     | 6    | 3     |
| % de incompletes                | 28,9 | 27,8 | 29,6  | 26,7 | 24,0  |
| ASD                             | 128  | 79   | 71    | 30   | 25    |
| <i>r</i> (B) <i>ace</i> (b)     | 6    | 12   | 6     | 2    | 3     |
| <i>r</i> (b)                    | 2    | 1    | 0     | 1    | 0     |
| altres                          | 0    | 3    | 0     | 1    | 2     |
| Alteracions complexes           |      |      |       |      |       |
| <i>t</i> (Ba) <i>ace</i> (ab)   | 12   | 5    | 3     | 1    | 5     |
| <i>dic</i> (BA) <i>t</i> (Ab)   | 5    | 2    | 6     | 1    | 1     |
| altres                          | 7    | 9    | 13    | 1    | 2     |
| % de complexes                  | 9,02 | 8,84 | 12,57 | 4,76 | 11,43 |
| T.D.                            | 16   | 7    | 8     | 9    | 1     |

AST i ASD, total de translocacions aparentment simples i dicèntrics respectivament. T.D., delecions terminals.

Taula 3. Resultats citogenètics per a cada dilució després de la irradiació a 4 Gy.

| Dosi(Gy)                        | 4     |       |       |       |      |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|------|
| dilució (%)                     | 87,5  | 75    | 50    | 25    | 12,5 |
| Cèl·lules analitzades           | 463   | 504   | 775   | 1035  | 1040 |
| Cèl·lules amb alteracions       | 168   | 128   | 119   | 66    | 37   |
| Alteracions simples             |       |       |       |       |      |
| <i>t</i> (Ba) <i>t</i> (Ab)     | 54    | 57    | 56    | 20    | 23   |
| <i>t</i> (Ba) <i>ace</i> (b)    | 3     | 1     | 2     | 0     | 0    |
| <i>t</i> (Ab)                   | 7     | 9     | 4     | 4     | 1    |
| <i>t</i> (Ba)                   | 8     | 5     | 4     | 5     | 0    |
| % de incompletes                | 25,0  | 20,8  | 15,2  | 31,0  | 4,2  |
| AST                             | 72    | 72    | 66    | 29    | 24   |
| <i>dic</i> (BA) <i>ace</i> (ab) | 72    | 57    | 50    | 28    | 12   |
| <i>dic</i> (BA) <i>ace</i> (b)  | 6     | 2     | 0     | 1     | 2    |
| <i>ace</i> (ab)                 | 4     | 2     | 5     | 1     | 0    |
| <i>dic</i> (BA)                 | 12    | 7     | 4     | 8     | 2    |
| % de incompletes                | 23,4  | 16,2  | 15,3  | 26,3  | 25,0 |
| ASD                             | 94    | 68    | 59    | 38    | 16   |
| <i>r</i> (B) <i>ace</i> (b)     | 4     | 5     | 6     | 3     | 1    |
| <i>r</i> (b)                    | 0     | 0     | 4     | 0     | 0    |
| altres                          | 0     | 0     | 1     | 3     | 0    |
| Alteracions complexes           |       |       |       |       |      |
| <i>t</i> (Ba) <i>ace</i> (ab)   | 6     | 2     | 3     | 3     | 0    |
| <i>dic</i> (BA) <i>t</i> (Ab)   | 10    | 9     | 12    | 1     | 0    |
| altres                          | 7     | 14    | 10    | 5     | 1    |
| % de complexes                  | 11,92 | 14,71 | 15,53 | 10,98 | 2,38 |
| T.D.                            | 8     | 2     | 0     | 3     | 0    |

AST i ASD, total de translocacions aparentment simples i dicèntrics respectivament. T.D., delecions terminals.

Taula 4. Resultats citogenètics per a cada dilució després de la irradiació a 5 Gy.

| Dosi(Gy)<br>dilució (%)         | 5     |       |       |       |       |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                 | 87,5  | 75    | 50    | 25    | 12,5  |
| Cèl·lules analitzades           | 374   | 553   | 523   | 890   | 1260  |
| Cèl·lules amb alteracions       | 175   | 164   | 87    | 78    | 42    |
| Alteracions simples             |       |       |       |       |       |
| <i>t</i> (Ba) <i>t</i> (Ab)     | 52    | 53    | 40    | 27    | 12    |
| <i>t</i> (Ba) <i>ace</i> (b)    | 8     | 6     | 2     | 0     | 0     |
| <i>t</i> (Ab)                   | 5     | 4     | 6     | 4     | 3     |
| <i>t</i> (Ba)                   | 10    | 10    | 1     | 5     | 1     |
| % de incompletes                | 30,7  | 27,4  | 11,1  | 25,0  | 25,0  |
| AST                             | 75    | 73    | 49    | 36    | 16    |
| <i>dic</i> (BA) <i>ace</i> (ab) | 71    | 78    | 30    | 36    | 18    |
| <i>dic</i> (BA) <i>ace</i> (b)  | 9     | 2     | 6     | 3     | 0     |
| <i>ace</i> (ab)                 | 4     | 5     | 1     | 0     | 0     |
| <i>dic</i> (BA)                 | 18    | 13    | 4     | 5     | 5     |
| % de incompletes                | 30,4  | 20,4  | 26,8  | 18,2  | 21,7  |
| ASD                             | 102   | 98    | 41    | 44    | 23    |
| <i>r</i> (B) <i>ace</i> (b)     | 8     | 9     | 6     | 5     | 3     |
| <i>r</i> (b)                    | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     |
| altres                          | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     |
| Alteracions complexes           |       |       |       |       |       |
| <i>t</i> (Ba) <i>ace</i> (ab)   | 8     | 7     | 2     | 3     | 5     |
| <i>dic</i> (BA) <i>t</i> (Ab)   | 20    | 8     | 12    | 5     | 1     |
| altres                          | 14    | 15    | 6     | 9     | 2     |
| % de complexes                  | 18,50 | 14,15 | 17,24 | 16,67 | 16,00 |
| T.D.                            | 13    | 7     | 3     | 4     | 2     |

AST i ASD, total de translocacions aparentment simples i dicèntrics respectivament. T.D., delecions terminals.

### 5.1.2. Detecció de la sobredispersió

Les anomalies considerades per a realitzar dosimetria biològica han estat translocacions i dicèntrics, les freqüències dels quals es mostren a la taula 5. Amb la nomenclatura PAINT modificada s'han considerat les translocacions completes ( $t(Ab)$   $t(Ba)$ ), el total de translocacions aparentment simples (AST) i els dicèntrics complets ( $dic(AB)$   $ace(ab)$ ) i el total de dicèntrics aparentment simples (ASD). Amb la nomenclatura convencional s'han considerat les translocacions i dicèntrics complets ( $t_c$ ,  $dic_c$ ) i totals ( $t_t$ ,  $dic_t$ ). Cal remarcar que en el cas de la nomenclatura PAINT modificada no s'inclouen les alteracions complexes, mentre que els dicèntrics i translocacions totals considerant la nomenclatura convencional si inclouen aquelles anomalies provinents d'alteracions complexes.

Malgrat que hi ha alguna excepció, en general la freqüència de cada una de les anomalies considerades disminueix clarament a mida que disminueix el percentatge de sang irradiada.

Per determinar quina anomalia de les 8 considerades és més útil per a detectar les irradiacions parcials i determinar correctament la dosi, s'han avaluat dues variables. D'una banda, la capacitat per a detectar la sobredispersió d'una mostra en relació a la distribució de Poisson, i per l'altre amb quina anomalia l'estimació de la dosi és més pròxima a la dosi real a la qual la mostra ha estat irradiada.

Taula 5. Freqüències per 100 cells  $\pm$  SE per cada dosi i dilució, de les diferents alteracions cromosòmiques considerades.

| Dosi (Gy) | % de sang irradiada | Nomenclatura PAINT |                  |                     |                  | Nomenclatura convencional |                  |                  |                  |
|-----------|---------------------|--------------------|------------------|---------------------|------------------|---------------------------|------------------|------------------|------------------|
|           |                     | t(Ba)<br>t(Ab)     | AST              | dic(BA)<br>ace (ab) | ASD              | t <sub>c</sub>            | t <sub>t</sub>   | dic <sub>c</sub> | dic <sub>t</sub> |
| 2         | 87,5                | 5,24 $\pm$ 0,73    | 7,08 $\pm$ 0,86  | 4,21 $\pm$ 0,64     | 6,67 $\pm$ 0,81  | 6,06 $\pm$ 0,78           | 8,01 $\pm$ 0,91  | 4,72 $\pm$ 0,68  | 7,19 $\pm$ 0,84  |
|           | 75                  | 4,00 $\pm$ 0,51    | 4,96 $\pm$ 0,57  | 4,06 $\pm$ 0,53     | 5,48 $\pm$ 0,61  | 4,58 $\pm$ 0,55           | 5,54 $\pm$ 0,60  | 4,58 $\pm$ 0,57  | 6,00 $\pm$ 0,64  |
|           | 50                  | 3,48 $\pm$ 0,52    | 4,46 $\pm$ 0,60  | 3,33 $\pm$ 0,50     | 4,16 $\pm$ 0,58  | 3,71 $\pm$ 0,53           | 4,69 $\pm$ 0,61  | 3,33 $\pm$ 0,50  | 4,24 $\pm$ 0,58  |
|           | 25                  | 1,45 $\pm$ 0,31    | 2,04 $\pm$ 0,38  | 1,98 $\pm$ 0,34     | 2,31 $\pm$ 0,41  | 1,72 $\pm$ 0,35           | 2,37 $\pm$ 0,41  | 2,04 $\pm$ 0,38  | 2,44 $\pm$ 0,43  |
|           | 12,5                | 0,76 $\pm$ 0,24    | 1,21 $\pm$ 0,30  | 0,61 $\pm$ 0,24     | 1,06 $\pm$ 0,30  | 1,06 $\pm$ 0,28           | 1,51 $\pm$ 0,34  | 0,76 $\pm$ 0,26  | 1,21 $\pm$ 0,32  |
| 3         | 87,5                | 8,95 $\pm$ 1,06    | 12,49 $\pm$ 1,24 | 10,72 $\pm$ 1,14    | 15,08 $\pm$ 1,35 | 11,43 $\pm$ 1,21          | 14,96 $\pm$ 1,36 | 11,66 $\pm$ 1,18 | 16,14 $\pm$ 1,39 |
|           | 75                  | 6,43 $\pm$ 0,91    | 8,50 $\pm$ 1,04  | 6,92 $\pm$ 0,95     | 9,59 $\pm$ 1,11  | 7,77 $\pm$ 0,99           | 9,95 $\pm$ 1,13  | 7,52 $\pm$ 0,98  | 10,44 $\pm$ 1,16 |
|           | 50                  | 6,24 $\pm$ 0,82    | 7,53 $\pm$ 0,90  | 4,46 $\pm$ 0,74     | 7,04 $\pm$ 0,90  | 8,33 $\pm$ 1,01           | 9,81 $\pm$ 1,08  | 6,05 $\pm$ 0,93  | 8,13 $\pm$ 0,97  |
|           | 25                  | 1,59 $\pm$ 0,40    | 2,43 $\pm$ 0,49  | 2,06 $\pm$ 0,47     | 2,80 $\pm$ 0,57  | 1,78 $\pm$ 0,43           | 2,62 $\pm$ 0,51  | 2,06 $\pm$ 0,47  | 2,90 $\pm$ 0,58  |
|           | 12,5                | 2,19 $\pm$ 0,46    | 2,92 $\pm$ 0,54  | 1,73 $\pm$ 0,39     | 2,28 $\pm$ 0,47  | 3,01 $\pm$ 0,56           | 3,74 $\pm$ 0,63  | 1,82 $\pm$ 0,40  | 2,37 $\pm$ 0,48  |
| 4         | 87,5                | 11,66 $\pm$ 1,55   | 15,55 $\pm$ 1,82 | 15,55 $\pm$ 1,82    | 20,30 $\pm$ 2,13 | 16,63 $\pm$ 1,89          | 20,52 $\pm$ 2,09 | 18,36 $\pm$ 2,02 | 23,11 $\pm$ 2,29 |
|           | 75                  | 11,38 $\pm$ 1,63   | 14,37 $\pm$ 1,85 | 11,38 $\pm$ 1,58    | 13,57 $\pm$ 1,75 | 15,97 $\pm$ 2,05          | 19,16 $\pm$ 2,22 | 13,77 $\pm$ 1,76 | 16,37 $\pm$ 1,94 |
|           | 50                  | 7,23 $\pm$ 1,10    | 8,52 $\pm$ 1,20  | 6,45 $\pm$ 0,92     | 7,61 $\pm$ 1,04  | 10,19 $\pm$ 1,30          | 11,48 $\pm$ 1,40 | 8,52 $\pm$ 1,08  | 9,81 $\pm$ 1,19  |
|           | 25                  | 1,93 $\pm$ 0,47    | 2,80 $\pm$ 0,55  | 2,71 $\pm$ 0,56     | 3,67 $\pm$ 0,66  | 2,51 $\pm$ 0,52           | 3,48 $\pm$ 0,62  | 2,80 $\pm$ 0,57  | 3,86 $\pm$ 0,67  |
|           | 12,5                | 2,21 $\pm$ 0,50    | 2,31 $\pm$ 0,50  | 1,15 $\pm$ 0,33     | 1,54 $\pm$ 0,41  | 2,21 $\pm$ 0,50           | 2,31 $\pm$ 0,50  | 1,35 $\pm$ 0,38  | 1,73 $\pm$ 0,45  |
| 5         | 87,5                | 13,90 $\pm$ 1,91   | 20,05 $\pm$ 2,36 | 18,98 $\pm$ 2,10    | 27,27 $\pm$ 2,63 | 24,06 $\pm$ 2,52          | 30,48 $\pm$ 2,87 | 26,47 $\pm$ 2,58 | 35,29 $\pm$ 3,07 |
|           | 75                  | 9,58 $\pm$ 1,30    | 13,20 $\pm$ 1,51 | 14,10 $\pm$ 1,76    | 17,72 $\pm$ 1,95 | 13,74 $\pm$ 1,57          | 18,08 $\pm$ 1,86 | 16,27 $\pm$ 1,96 | 20,25 $\pm$ 2,14 |
|           | 50                  | 7,65 $\pm$ 1,31    | 9,37 $\pm$ 1,36  | 5,74 $\pm$ 1,15     | 7,84 $\pm$ 1,32  | 11,08 $\pm$ 1,57          | 12,81 $\pm$ 1,72 | 8,99 $\pm$ 1,44  | 11,09 $\pm$ 1,57 |
|           | 25                  | 3,03 $\pm$ 0,62    | 4,04 $\pm$ 0,73  | 4,04 $\pm$ 0,72     | 4,94 $\pm$ 0,81  | 4,74 $\pm$ 0,78           | 5,84 $\pm$ 0,88  | 5,06 $\pm$ 0,82  | 5,96 $\pm$ 0,91  |
|           | 12,5                | 0,95 $\pm$ 0,32    | 1,27 $\pm$ 0,37  | 1,43 $\pm$ 0,37     | 1,83 $\pm$ 0,42  | 1,51 $\pm$ 0,38           | 1,83 $\pm$ 0,42  | 1,75 $\pm$ 0,42  | 2,14 $\pm$ 0,47  |

AST i ASD, total de translocacions i dicèntrics aparentment simples respectivament, t<sub>c</sub> i t<sub>t</sub>, dic<sub>c</sub> i dic<sub>t</sub>, translocacions i dicèntrics complets i totals respectivament.

Per a cada alteració, a les taules 6 a 13 es pot observar la dosi d'irradiació, el percentatge de sang irradiada, la distribució d'aberracions per cèl·lula, els valors dels tests  $u$  i  $s$ , i la dosi estimada considerant la irradiació com a total o com a parcial. Els resultats de les alteracions tipus translocació detectades utilitzant la nomenclatura PAINT es mostren en les taules 6 i 7, i utilitzant la nomenclatura convencional en les taules 8 i 9. Pel que fa a les anomalies tipus dicèntric, les taules 10 i 11 mostren els resultats utilitzant la nomenclatura PAINT, i les taules 12 i 13 utilitzant la nomenclatura convencional.

Per a les quatre dosis estudiades s'han calculat 160 valors del test  $u$  i 160 del test  $s$ . D'aquests, 79 valors del test  $u$  i 80 del test  $s$  són superiors a 1,96, indicant sobredispersió. Dels casos que mostren sobredispersió, en 77 coincideixen els tests  $u$  i  $s$ . Cal tenir present, que quan s'hibriden 3 cromosomes, només es tenen en compte les anomalies dels cromosomes pintats i que és molt difícil trobar cèl·lules amb de 3 anomalies cromosòmiques. Això, dificulta la detecció de desviacions de la distribució de Poisson.

A 2 Gy hi ha disset valors de  $u$  i de  $s$  superiors a 1,96, catorze dels quals corresponen als percentatges de 12,5 i 25% de sang irradiada. A 3 Gy 32 valors mostren sobredispersió i es corresponen als percentatges de 12,5, 25 i 50% de sang irradiada. A 4 Gy i 5Gy, hi ha 53 i 56 valors respectivament que mostren sobredispersió en les dilucions de 12,5, 25, 50 i 75% de sang irradiada. En cap cas la dilució del 87,5% de sang irradiada mostra sobredispersió.

En general, la sobredispersió és detecta amb més facilitat a dosis elevades i a percentatges baixos de sang irradiada.



Taula 6.- Distribució per cèl·lula de translocacions aparentment simples completes (t(Ab) t(Ba)) i estimacions de la dosi.

| Dosi (Gy) | % sang irradiada | Cel  | Distribució d'aberracions per cèl·lula |   |   | u     | s     | X/(N-n <sub>0</sub> ) ± SE | λ    | Dosi total | Dosi parcial (95%) |              |
|-----------|------------------|------|----------------------------------------|---|---|-------|-------|----------------------------|------|------------|--------------------|--------------|
|           |                  |      | 1                                      | 2 | 3 |       |       |                            |      |            |                    |              |
| 2         | 87,5             | 974  | 49                                     | 1 | 0 | -0,27 | -0,28 | 1,02±0,02                  | 0,04 | 1,73       | 1,44               | (0,00-2,83)  |
|           | 75,0             | 1551 | 58                                     | 2 | 0 | 0,71  | 0,72  | 1,03±0,02                  | 0,07 | 1,45       | 2,00               | (0,00-3,35)  |
|           | 50,0             | 1322 | 44                                     | 1 | 0 | 0,25  | 0,24  | 1,02±0,02                  | 0,04 | 1,32       | 1,55               | (0,00-3,01)  |
|           | 25,0             | 1516 | 22                                     | 0 | 0 | -0,39 | -0,40 | 1,00±0,00                  | 0,00 | 0,68       | 0,00               | (0,00-0,00)  |
|           | 12,5             | 1322 | 10                                     | 0 | 0 | -0,18 | -0,20 | 1,00±0,00                  | 0,00 | 0,37       | 0,00               | (0,00-0,00)  |
| 3         | 87,5             | 849  | 64                                     | 6 | 0 | 1,44  | 1,58  | 1,09±0,04                  | 0,17 | 2,42       | 3,49               | (1,25-4,82)  |
|           | 75,0             | 824  | 47                                     | 3 | 0 | 1,03  | 1,08  | 1,06±0,03                  | 0,12 | 1,97       | 2,85               | (0,00-4,36)  |
|           | 50,0             | 1009 | 53                                     | 5 | 0 | 2,20  | 2,31  | 1,09±0,04                  | 0,17 | 1,94       | 3,50               | (0,85-4,95)  |
|           | 25,0             | 1070 | 15                                     | 1 | 0 | 2,45  | 2,39  | 1,06±0,06                  | 0,12 | 0,73       | 2,92               | (0,00-5,31)  |
|           | 12,5             | 1096 | 22                                     | 1 | 0 | 1,49  | 1,47  | 1,04±0,04                  | 0,09 | 0,94       | 2,36               | (0,00-4,37)  |
| 4         | 87,5             | 463  | 50                                     | 2 | 0 | -0,62 | -0,64 | 1,04±0,03                  | 0,08 | 2,83       | 2,19               | (0,00-3,63)  |
|           | 75,0             | 504  | 44                                     | 5 | 1 | 2,72  | 2,38  | 1,14±0,05                  | 0,27 | 2,78       | 4,57               | (2,03-6,12)  |
|           | 50,0             | 775  | 39                                     | 7 | 1 | 5,69  | 5,24  | 1,19±0,07                  | 0,36 | 2,12       | 5,39               | (2,93-6,99)  |
|           | 25,0             | 1035 | 16                                     | 2 | 0 | 4,24  | 4,18  | 1,11±0,08                  | 0,21 | 0,86       | 4,03               | (0,00-6,39)  |
|           | 12,5             | 1040 | 19                                     | 2 | 0 | 3,56  | 3,53  | 1,10±0,07                  | 0,18 | 0,95       | 3,70               | (0,00-5,91)  |
| 5         | 87,5             | 374  | 46                                     | 3 | 0 | -0,29 | -0,27 | 1,06±0,04                  | 0,12 | 3,14       | 2,88               | (0,00-4,41)  |
|           | 75,0             | 553  | 49                                     | 2 | 0 | -0,31 | -0,31 | 1,04±0,03                  | 0,08 | 2,52       | 2,21               | (0,00-3,67)  |
|           | 50,0             | 523  | 33                                     | 2 | 1 | 2,88  | 2,16  | 1,11±0,06                  | 0,21 | 2,20       | 4,03               | (-0,13-5,81) |
|           | 25,0             | 890  | 23                                     | 2 | 0 | 2,56  | 2,56  | 1,08±0,06                  | 0,16 | 1,20       | 3,36               | (0,00-5,40)  |
|           | 12,5             | 1260 | 8                                      | 2 | 0 | 8,51  | 8,19  | 1,20±0,15                  | 0,38 | 0,46       | 5,51               | (0,00-8,55)  |

Els valors de u i s >1,96 indiquen sobredispersió; Cel: cèl·lules analitzades. A la dosi total i parcial es mostra entre parèntesis els valors dels intervals de confiança del 95%.

## Resultats

Taula 7.- Distribució per cèl·lula del total de translocacions aparentment simples (AST) i estimacions de la dosi.

| Dosi (Gy) | % sang irradiada | Cel  | Distribució d'aberracions per cèl·lula |    |   | u     | s     | $X/(N-n_0) \pm SE$ | $\lambda$ | Dosi total | Dosi parcial (95%) |              |
|-----------|------------------|------|----------------------------------------|----|---|-------|-------|--------------------|-----------|------------|--------------------|--------------|
|           |                  |      | 1                                      | 2  | 3 |       |       |                    |           |            |                    |              |
| 2         | 87,5             | 974  | 63                                     | 3  | 0 | 0,38  | 0,41  | 1,05±0,03          | 0,09      | 1,61       | 1,89               | (-, 3,04)    |
|           | 75,0             | 1551 | 73                                     | 2  | 0 | 0,08  | 0,09  | 1,03±0,02          | 0,05      | 1,25       | 1,31               | (-, 2,35)    |
|           | 50,0             | 1322 | 53                                     | 3  | 0 | 1,50  | 1,54  | 1,05±0,03          | 0,11      | 1,16       | 2,10               | (-, 3,35)    |
|           | 25,0             | 1516 | 29                                     | 1  | 0 | 1,25  | 1,24  | 1,03±0,03          | 0,07      | 0,61       | 1,53               | (-, 3,07)    |
|           | 12,5             | 1322 | 16                                     | 0  | 0 | -0,30 | -0,31 | 1,00±0,00          | -         | 0,36       | -                  | (-, -)       |
| 3         | 87,5             | 849  | 91                                     | 6  | 1 | 0,96  | 0,71  | 1,08±0,03          | 0,16      | 2,35       | 2,74               | (1,23, 3,74) |
|           | 75,0             | 824  | 60                                     | 5  | 0 | 1,21  | 1,31  | 1,08±0,03          | 0,15      | 1,83       | 2,64               | (0,52, 3,84) |
|           | 50,0             | 1009 | 64                                     | 6  | 0 | 1,89  | 2,02  | 1,09±0,04          | 0,17      | 1,68       | 2,82               | (0,90, 3,98) |
|           | 25,0             | 1070 | 24                                     | 1  | 0 | 1,26  | 1,25  | 1,04±0,04          | 0,08      | 0,71       | 1,74               | (-, 3,42)    |
|           | 12,5             | 1096 | 28                                     | 2  | 0 | 2,30  | 2,30  | 1,07±0,05          | 0,13      | 0,83       | 2,42               | (-, 4,05)    |
| 4         | 87,5             | 463  | 65                                     | 2  | 1 | -0,22 | -0,63 | 1,06±0,03          | 0,12      | 2,70       | 2,23               | (-, 3,39)    |
|           | 75,0             | 504  | 51                                     | 9  | 1 | 3,08  | 3,03  | 1,18±0,06          | 0,34      | 2,56       | 4,33               | (2,51, 5,59) |
|           | 50,0             | 775  | 43                                     | 10 | 1 | 6,15  | 5,93  | 1,22±0,07          | 0,42      | 1,83       | 4,85               | (2,95, 6,18) |
|           | 25,0             | 1035 | 25                                     | 2  | 0 | 2,57  | 2,57  | 1,07±0,05          | 0,14      | 0,80       | 2,58               | (-, 4,30)    |
|           | 12,5             | 1040 | 20                                     | 2  | 0 | 3,37  | 3,34  | 1,09±0,07          | 0,18      | 0,68       | 2,92               | (-, 4,81)    |
| 5         | 87,5             | 374  | 57                                     | 9  | 0 | 0,58  | 0,84  | 1,14±0,05          | 0,26      | 3,16       | 3,70               | (1,89, 4,91) |
|           | 75,0             | 553  | 67                                     | 3  | 0 | -0,80 | -0,82 | 1,04±0,02          | 0,08      | 2,43       | 1,82               | (-, 2,94)    |
|           | 50,0             | 523  | 38                                     | 4  | 1 | 3,17  | 2,69  | 1,14±0,06          | 0,27      | 1,95       | 3,75               | (1,27, 5,21) |
|           | 25,0             | 890  | 28                                     | 4  | 0 | 3,92  | 3,98  | 1,13±0,06          | 0,24      | 1,07       | 3,52               | (-, 5,17)    |
|           | 12,5             | 1260 | 10                                     | 3  | 0 | 9,42  | 9,19  | 1,23±0,14          | 0,43      | 0,38       | 4,95               | (-, 7,37)    |

Els valors de u i s >1,96 indiquen sobredispersió; Cel: cèl·lules analitzades. A la dosi total i parcial es mostra entre parèntesis els valors dels intervals de confiança del 95%.

Taula 8.- Distribució per cèl·lula de translocacions completes ( $t_c$ ) i estimacions de la dosi.

| Dosi (Gy) | % sang irradiada | Cel  | Distribució d'aberracions per cèl·lula |    |   | u     | s     | $\bar{X}/(N-n_0) \pm SE$ | $\lambda$ | Dosi total | Dosi parcial (95%) |              |
|-----------|------------------|------|----------------------------------------|----|---|-------|-------|--------------------------|-----------|------------|--------------------|--------------|
|           |                  |      | 1                                      | 2  | 3 |       |       |                          |           |            |                    |              |
| 2         | 87,5             | 974  | 57                                     | 1  | 0 | -0,57 | -0,59 | 1,02±0,02                | 0,03      | 1,54       | 1,07               | (0,00-2,08)  |
|           | 75,0             | 1551 | 67                                     | 2  | 0 | 0,31  | 0,33  | 1,03±0,02                | 0,06      | 1,29       | 1,49               | (0,00-2,47)  |
|           | 50,0             | 1322 | 47                                     | 1  | 0 | 0,12  | 0,11  | 1,02±0,02                | 0,04      | 1,13       | 1,21               | (0,00-2,31)  |
|           | 25,0             | 1516 | 24                                     | 1  | 0 | 1,70  | 1,67  | 1,04±0,03                | 0,08      | 0,66       | 1,80               | (0,00-3,31)  |
|           | 12,5             | 1322 | 14                                     | 0  | 0 | -0,26 | -0,27 | 1,00±0,00                | 0,00      | 0,45       | 0,00               | (0,00-0,00)  |
| 3         | 87,5             | 849  | 80                                     | 7  | 1 | 1,93  | 1,71  | 1,10±0,03                | 0,20      | 2,24       | 3,05               | (1,65-3,99)  |
|           | 75,0             | 824  | 56                                     | 4  | 0 | 0,99  | 1,07  | 1,07±0,03                | 0,13      | 1,78       | 2,41               | (-0,07-3,50) |
|           | 50,0             | 1009 | 64                                     | 7  | 2 | 5,14  | 4,36  | 1,15±0,05                | 0,29      | 1,86       | 3,75               | (2,27-4,77)  |
|           | 25,0             | 1070 | 17                                     | 1  | 0 | 2,10  | 2,06  | 1,06±0,06                | 0,11      | 0,68       | 2,18               | (0,00-3,93)  |
|           | 12,5             | 1096 | 27                                     | 3  | 0 | 3,63  | 3,65  | 1,10±0,06                | 0,19      | 0,98       | 3,01               | (0,00-4,50)  |
| 4         | 87,5             | 463  | 68                                     | 3  | 1 | -0,13 | -0,48 | 1,07±0,03                | 0,14      | 2,77       | 2,47               | (0,62-3,48)  |
|           | 75,0             | 504  | 54                                     | 7  | 4 | 5,09  | 4,06  | 1,23±0,06                | 0,43      | 2,70       | 4,66               | (3,18-5,73)  |
|           | 50,0             | 775  | 52                                     | 12 | 1 | 5,53  | 5,48  | 1,22±0,06                | 0,40      | 2,09       | 4,50               | (3,00-5,58)  |
|           | 25,0             | 1035 | 22                                     | 2  | 0 | 3,01  | 3,00  | 1,08±0,06                | 0,16      | 0,87       | 2,73               | (0,00-4,34)  |
|           | 12,5             | 1040 | 19                                     | 2  | 0 | 3,56  | 3,53  | 1,10±0,07                | 0,18      | 0,79       | 2,94               | (0,00-4,64)  |
| 5         | 87,5             | 374  | 70                                     | 10 | 0 | -0,22 | 0,00  | 1,13±0,04                | 0,24      | 3,40       | 3,40               | (1,96-4,38)  |
|           | 75,0             | 553  | 66                                     | 5  | 0 | -0,07 | 0,00  | 1,07±0,03                | 0,14      | 2,49       | 2,49               | (0,62-3,51)  |
|           | 50,0             | 523  | 45                                     | 5  | 1 | 2,72  | 2,38  | 1,14±0,05                | 0,26      | 2,20       | 3,57               | (1,62-4,76)  |
|           | 25,0             | 890  | 34                                     | 4  | 0 | 3,08  | 3,16  | 1,11±0,05                | 0,20      | 1,32       | 3,10               | (-0,12-4,44) |
|           | 12,5             | 1260 | 15                                     | 2  | 0 | 5,06  | 4,97  | 1,12±0,08                | 0,23      | 0,60       | 3,29               | (0,00-5,16)  |

Els valors de u i s >1,96 indiquen sobredispersió; Cel: cèl·lules analitzades. A la dosi total i parcial es mostra entre parèntesis els valors dels intervals de confiança del 95%.

Taula 9.- Distribució per cèl·lula de translocacions totals ( $t_t$ ) i estimacions de la dosi.

| Dosi (Gy) | % sang irradiada | Cel  | Distribució d'aberracions per cèl·lula |    |   | u     | s     | $X/(N-n_0) \pm SE$ | $\lambda$ | Dosi total | Dosi parcial (95%) |              |
|-----------|------------------|------|----------------------------------------|----|---|-------|-------|--------------------|-----------|------------|--------------------|--------------|
|           |                  |      | 1                                      | 2  | 3 |       |       |                    |           |            |                    |              |
| 2         | 87,5             | 974  | 72                                     | 3  | 0 | -0,05 | -0,03 | 1,040±0,02         | 0,079     | 1,50       | 1,49               | (0,00-2,36)  |
|           | 75,0             | 1551 | 82                                     | 2  | 0 | -0,23 | 0,23  | 1,024±0,02         | 0,047     | 1,17       | 1,05               | (0,00-1,85)  |
|           | 50,0             | 1322 | 56                                     | 3  | 0 | 1,31  | 1,35  | 1,051±0,03         | 0,100     | 1,04       | 1,73               | (0,00-2,71)  |
|           | 25,0             | 1516 | 32                                     | 2  | 0 | 2,46  | 2,46  | 1,059±0,04         | 0,115     | 0,62       | 1,89               | (0,00-3,14)  |
|           | 12,5             | 1322 | 20                                     | 0  | 0 | -0,38 | -0,39 | 1,000±0,00         | 0,000     | 0,42       | 0,00               | (0,00-0,00)  |
| 3         | 87,5             | 849  | 107                                    | 7  | 2 | 1,17  | 0,72  | 1,095±0,03         | 0,184     | 2,21       | 2,51               | (1,44-3,26)  |
|           | 75,0             | 824  | 70                                     | 6  | 0 | 0,98  | 1,10  | 1,079±0,03         | 0,154     | 1,72       | 2,25               | (0,75-3,16)  |
|           | 50,0             | 1009 | 75                                     | 9  | 2 | 4,65  | 4,09  | 1,151±0,04         | 0,288     | 1,71       | 3,26               | (2,05-4,13)  |
|           | 25,0             | 1070 | 26                                     | 1  | 0 | 1,09  | 1,08  | 1,037±0,04         | 0,073     | 0,68       | 1,41               | (0,00-2,73)  |
|           | 12,5             | 1096 | 33                                     | 4  | 0 | 3,76  | 3,88  | 1,108±0,05         | 0,209     | 0,89       | 2,70               | (-0,10-3,94) |
| 4         | 87,5             | 463  | 83                                     | 3  | 2 | -0,21 | -0,80 | 1,080±0,03         | 0,155     | 2,67       | 2,26               | (0,92-3,11)  |
|           | 75,0             | 504  | 62                                     | 11 | 4 | 4,63  | 4,03  | 1,247±0,06         | 0,459     | 2,56       | 4,23               | (3,02-5,14)  |
|           | 50,0             | 775  | 54                                     | 16 | 1 | 6,21  | 6,37  | 1,254±0,06         | 0,470     | 1,88       | 4,29               | (3,03-5,23)  |
|           | 25,0             | 1035 | 30                                     | 3  | 0 | 3,07  | 3,10  | 1,091±0,05         | 0,177     | 0,84       | 2,45               | (0,00-3,74)  |
|           | 12,5             | 1040 | 20                                     | 2  | 0 | 3,37  | 3,34  | 1,091±0,07         | 0,177     | 0,61       | 2,45               | (0,00-3,97)  |
| 5         | 87,5             | 374  | 81                                     | 15 | 1 | 0,19  | 0,39  | 1,175±0,04         | 0,332     | 3,36       | 3,53               | (2,43-4,35)  |
|           | 75,0             | 553  | 82                                     | 6  | 2 | 1,02  | 0,57  | 1,111±0,04         | 0,215     | 2,48       | 2,74               | (1,51-3,59)  |
|           | 50,0             | 523  | 48                                     | 8  | 1 | 3,30  | 3,16  | 1,175±0,06         | 0,332     | 2,01       | 3,53               | (1,99-4,57)  |
|           | 25,0             | 890  | 40                                     | 6  | 0 | 3,70  | 3,84  | 1,130±0,05         | 0,250     | 1,22       | 3,00               | (1,06-4,14)  |
|           | 12,5             | 1260 | 17                                     | 3  | 0 | 6,25  | 6,19  | 1,150±0,09         | 0,286     | 0,50       | 3,24               | (0,00-4,86)  |

Els valors de u i s >1,96 indiquen sobredispersió; Cel: cèl·lules analitzades. A la dosi total i parcial es mostra entre parèntesis els valors dels intervals de confiança del 95%.

Taula 10.- Distribució per cèl·lula de dicèntrics aparentment simples complets (dic(BA ace(ab))) i estimacions de la dosi.

| Dosi (Gy) | % sang irradiada | Cel  | Distribució d'aberracions per cèl·lula |    |   | u     | s     | X/(N-n <sub>0</sub> ) ± SE | λ    | Dosi total | Dosi parcial (95%) |             |
|-----------|------------------|------|----------------------------------------|----|---|-------|-------|----------------------------|------|------------|--------------------|-------------|
|           |                  |      | 1                                      | 2  | 3 |       |       |                            |      |            |                    |             |
| 2         | 87,5             | 974  | 41                                     | 0  | 0 | -0,92 | -0,95 | 1,00±0,00                  | 0,00 | 1,60       | 0,00               | (0,00-0,00) |
|           | 75,0             | 1551 | 57                                     | 3  | 0 | 1,55  | 1,59  | 1,05±0,03                  | 0,10 | 1,57       | 2,68               | (0,00-4,09) |
|           | 50,0             | 1322 | 42                                     | 1  | 0 | 0,34  | 0,33  | 1,02±0,02                  | 0,05 | 1,38       | 1,70               | (0,00-3,21) |
|           | 25,0             | 1516 | 28                                     | 1  | 0 | 1,33  | 1,32  | 1,03±0,03                  | 0,07 | 0,98       | 2,15               | (0,00-4,00) |
|           | 12,5             | 1322 | 6                                      | 1  | 0 | 6,73  | 6,70  | 1,14±0,15                  | 0,27 | 0,41       | 4,77               | (0,00-8,31) |
| 3         | 87,5             | 849  | 79                                     | 6  | 0 | 0,54  | 0,64  | 1,07±0,03                  | 0,14 | 2,81       | 3,25               | (1,20-4,50) |
|           | 75,0             | 824  | 49                                     | 4  | 0 | 1,48  | 1,56  | 1,08±0,04                  | 0,15 | 2,17       | 3,38               | (0,10-4,90) |
|           | 50,0             | 1009 | 42                                     | 4  | 0 | 2,53  | 2,60  | 1,09±0,04                  | 0,17 | 1,77       | 3,65               | (0,09-5,28) |
|           | 25,0             | 1070 | 18                                     | 2  | 0 | 3,84  | 3,80  | 1,10±0,07                  | 0,19 | 1,00       | 3,94               | (0,00-6,25) |
|           | 12,5             | 1096 | 19                                     | 0  | 0 | -0,40 | -0,41 | 1,00±0,00                  | 0,00 | 0,89       | 0,00               | (0,00-0,00) |
| 4         | 87,5             | 463  | 62                                     | 5  | 0 | -0,22 | 0,15  | 1,07±0,03                  | 0,15 | 3,48       | 3,36               | (0,88-4,74) |
|           | 75,0             | 504  | 45                                     | 6  | 0 | 1,59  | 1,77  | 1,12±0,05                  | 0,23 | 2,90       | 4,31               | (1,63-5,88) |
|           | 50,0             | 775  | 46                                     | 2  | 0 | 0,33  | 0,35  | 1,04±0,03                  | 0,08 | 2,08       | 2,41               | (0,00-3,94) |
|           | 25,0             | 1035 | 22                                     | 3  | 0 | 4,36  | 4,36  | 1,12±0,07                  | 0,23 | 1,21       | 4,35               | (0,00-6,48) |
|           | 12,5             | 1040 | 12                                     | 0  | 0 | -0,25 | -0,26 | 1,00±0,00                  | 0,00 | 0,67       | 0,00               | (0,00-0,00) |
| 5         | 87,5             | 374  | 67                                     | 2  | 0 | -1,80 | -1,95 | 1,03±0,02                  | 0,06 | 3,90       | 1,94               | (0,00-3,22) |
|           | 75,0             | 553  | 53                                     | 11 | 1 | 3,68  | 3,71  | 1,20±0,06                  | 0,38 | 3,30       | 5,69               | (3,68-7,12) |
|           | 50,0             | 523  | 22                                     | 4  | 0 | 3,48  | 3,57  | 1,15±0,08                  | 0,29 | 1,94       | 4,96               | (0,00-7,07) |
|           | 25,0             | 890  | 30                                     | 3  | 0 | 2,73  | 2,77  | 1,09±0,05                  | 0,18 | 1,56       | 3,74               | (0,00-5,62) |
|           | 12,5             | 1260 | 14                                     | 2  | 0 | 5,39  | 5,28  | 1,13±0,09                  | 0,24 | 0,78       | 4,45               | (0,00-7,00) |

Els valors de u i s >1,96 indiquen sobredispersió; Cel: cèl·lules analitzades. A la dosi total i parcial es mostra entre parèntesis els valors dels intervals de confiança del 95%.

## Resultats

Taula 11.- Distribució per cèl·lula del total de dicèntrics aparentment simples (ASD) i estimacions de la dosi.

| Dosi (Gy) | % sang irradiada | Cel  | Distribució d'aberracions per cèl·lula |    |   | u     | s     | X/(N-n <sub>0</sub> ) ± SE | λ    | Dosi total | Dosi parcial (95%) |             |
|-----------|------------------|------|----------------------------------------|----|---|-------|-------|----------------------------|------|------------|--------------------|-------------|
|           |                  |      | 1                                      | 2  | 3 |       |       |                            |      |            |                    |             |
| 2         | 87,5             | 974  | 63                                     | 1  | 0 | -0,78 | -0,80 | 1,02±0,02                  | 0,03 | 1,68       | 1,03               | (0,00-2,03) |
|           | 75,0             | 1551 | 77                                     | 4  | 0 | 1,12  | 1,17  | 1,05±0,02                  | 0,10 | 1,48       | 2,11               | (0,07-3,12) |
|           | 50,0             | 1322 | 49                                     | 3  | 0 | 1,77  | 1,81  | 1,06±0,03                  | 0,11 | 1,24       | 2,31               | (0,00-3,54) |
|           | 25,0             | 1516 | 31                                     | 2  | 0 | 2,57  | 2,56  | 1,06±0,04                  | 0,12 | 0,84       | 2,37               | (0,00-3,86) |
|           | 12,5             | 1322 | 12                                     | 1  | 0 | 3,55  | 3,43  | 1,08±0,08                  | 0,15 | 0,47       | 2,72               | (0,00-4,90) |
| 3         | 87,5             | 849  | 106                                    | 11 | 0 | 0,46  | 0,66  | 1,09±0,03                  | 0,18 | 2,73       | 3,04               | (1,79-3,93) |
|           | 75,0             | 824  | 67                                     | 6  | 0 | 1,17  | 1,30  | 1,08±0,03                  | 0,16 | 2,09       | 2,82               | (1,02-3,91) |
|           | 50,0             | 1009 | 58                                     | 5  | 1 | 3,53  | 3,06  | 1,11±0,04                  | 0,21 | 1,73       | 3,31               | (1,46-4,47) |
|           | 25,0             | 1070 | 22                                     | 4  | 0 | 5,64  | 5,66  | 1,15±0,08                  | 0,29 | 0,96       | 3,98               | (0,00-5,69) |
|           | 12,5             | 1096 | 23                                     | 1  | 0 | 1,39  | 1,37  | 1,04±0,04                  | 0,08 | 0,83       | 1,90               | (0,00-3,54) |
| 4         | 87,5             | 463  | 72                                     | 11 | 0 | 0,51  | 0,79  | 1,13±0,04                  | 0,25 | 3,23       | 3,67               | (2,19-4,71) |
|           | 75,0             | 504  | 53                                     | 6  | 1 | 2,11  | 1,89  | 1,13±0,05                  | 0,26 | 2,56       | 3,68               | (1,83-4,88) |
|           | 50,0             | 775  | 49                                     | 5  | 0 | 1,88  | 2,00  | 1,09±0,04                  | 0,18 | 1,82       | 3,02               | (0,77-4,26) |
|           | 25,0             | 1035 | 28                                     | 5  | 0 | 5,25  | 5,32  | 1,15±0,07                  | 0,29 | 1,15       | 3,95               | (1,03-5,50) |
|           | 12,5             | 1040 | 14                                     | 1  | 0 | 2,61  | 2,53  | 1,07±0,07                  | 0,13 | 0,63       | 2,51               | (0,00-4,55) |
| 5         | 87,5             | 374  | 80                                     | 11 | 0 | -0,75 | -0,59 | 1,12±0,04                  | 0,23 | 3,82       | 3,49               | (2,07-4,49) |
|           | 75,0             | 553  | 65                                     | 15 | 1 | 3,21  | 3,46  | 1,21±0,05                  | 0,39 | 2,99       | 4,68               | (3,27-5,73) |
|           | 50,0             | 523  | 31                                     | 5  | 0 | 2,74  | 2,89  | 1,14±0,06                  | 0,27 | 1,85       | 3,77               | (0,98-5,26) |
|           | 25,0             | 890  | 34                                     | 5  | 0 | 3,82  | 3,93  | 1,13±0,06                  | 0,25 | 1,39       | 3,61               | (0,94-5,05) |
|           | 12,5             | 1260 | 17                                     | 3  | 0 | 6,25  | 6,19  | 1,15±0,09                  | 0,29 | 0,71       | 3,93               | (0,00-5,83) |

Els valors de u i s >1,96 indiquen sobredispersió; Cel: cèl·lules analitzades. A la dosi total i parcial es mostra entre parèntesis els valors dels intervals de confiança del 95%.

Taula 12.- Distribució per cèl·lula de dicèntrics complets ( $d_c$ ) i estimacions de la dosi.

| Dosi (Gy) | % sang irradiada | Cel  | Distribució d'aberracions per cèl·lula |    |   | u     | s     | $X/(N-n_0) \pm SE$ | $\lambda$ | Dosi total | Dosi parcial (95%) |             |
|-----------|------------------|------|----------------------------------------|----|---|-------|-------|--------------------|-----------|------------|--------------------|-------------|
|           |                  |      | 1                                      | 2  | 3 |       |       |                    |           |            |                    |             |
|           |                  |      |                                        |    |   |       |       |                    |           |            |                    |             |
| 2         | 87,5             | 974  | 46                                     | 0  | 0 | -1,03 | -1,07 | 1,000±0,00         | 0,000     | 1,50       | 0,00               | (0,00-0,00) |
|           | 75,0             | 1551 | 61                                     | 5  | 0 | 2,69  | 2,77  | 1,076±0,03         | 0,148     | 1,48       | 2,86               | (0,81-3,98) |
|           | 50,0             | 1322 | 42                                     | 1  | 0 | 0,39  | 0,33  | 1,023±0,02         | 0,046     | 1,22       | 1,48               | (0,00-2,72) |
|           | 25,0             | 1516 | 29                                     | 1  | 0 | 1,25  | 1,24  | 1,033±0,03         | 0,066     | 0,91       | 1,82               | (0,00-3,29) |
|           | 12,5             | 1322 | 8                                      | 1  | 0 | 5,24  | 4,98  | 1,111±0,11         | 0,215     | 0,47       | 3,50               | (0,00-6,06) |
| 3         | 87,5             | 849  | 87                                     | 6  | 0 | 0,12  | 0,20  | 1,065±0,03         | 0,126     | 2,51       | 2,62               | (1,02-3,59) |
|           | 75,0             | 824  | 54                                     | 4  | 0 | 1,13  | 1,20  | 1,069±0,03         | 0,135     | 1,96       | 2,72               | (0,11-3,90) |
|           | 50,0             | 1009 | 49                                     | 6  | 0 | 3,11  | 3,25  | 1,109±0,05         | 0,211     | 1,73       | 3,46               | (1,37-4,70) |
|           | 25,0             | 1070 | 18                                     | 2  | 0 | 3,84  | 3,80  | 1,100±0,07         | 0,194     | 0,91       | 3,31               | (0,00-5,18) |
|           | 12,5             | 1096 | 20                                     | 0  | 0 | -0,42 | -0,43 | 1,000±0,00         | 0,000     | 0,84       | 0,00               | (0,00-0,00) |
| 4         | 87,5             | 463  | 70                                     | 6  | 1 | 0,46  | 0,27  | 1,104±0,04         | 0,201     | 3,22       | 3,38               | (1,74-4,44) |
|           | 75,0             | 504  | 51                                     | 9  | 0 | 2,02  | 2,31  | 1,150±0,05         | 0,286     | 2,74       | 4,08               | (2,28-5,28) |
|           | 50,0             | 775  | 59                                     | 2  | 1 | 1,34  | 0,81  | 1,065±0,03         | 0,126     | 2,11       | 2,62               | (0,11-3,77) |
|           | 25,0             | 1035 | 23                                     | 3  | 0 | 4,17  | 4,17  | 1,115±0,07         | 0,223     | 1,10       | 3,57               | (0,00-5,26) |
|           | 12,5             | 1040 | 12                                     | 1  | 0 | 3,09  | 2,99  | 1,077±0,08         | 0,150     | 0,69       | 2,88               | (0,00-5,06) |
| 5         | 87,5             | 374  | 82                                     | 7  | 1 | -0,83 | -1,04 | 1,100±0,03         | 0,194     | 3,92       | 3,31               | (1,83-4,30) |
|           | 75,0             | 553  | 54                                     | 15 | 2 | 5,12  | 5,10  | 1,268±0,06         | 0,495     | 3,01       | 5,45               | (3,98-6,56) |
|           | 50,0             | 523  | 33                                     | 7  | 0 | 3,43  | 3,67  | 1,175±0,07         | 0,332     | 2,17       | 4,42               | (2,07-5,84) |
|           | 25,0             | 890  | 35                                     | 5  | 0 | 3,64  | 3,80  | 1,125±0,06         | 0,240     | 1,56       | 3,72               | (1,07-5,14) |
|           | 12,5             | 1260 | 16                                     | 3  | 0 | 6,58  | 6,50  | 1,158±0,09         | 0,301     | 0,82       | 4,19               | (0,00-6,13) |

Els valors de u i s >1,96 indiquen sobredispersió; Cel: cèl·lules analitzades. A la dosi total i parcial es mostra entre parèntesis els valors dels intervals de confiança del 95%.

Taula 13.- Distribució per cèl·lula dicèntrics totals ( $d_t$ ) i estimacions de la dosi.

| Dosi (Gy) | % sang irradiada | Cel  | Distribució d'aberracions per cèl·lula |    |   | u     | s     | $X/(N-n_0) \pm SE$ | $\lambda$ | Dosi total | Dosi parcial (95%) |             |
|-----------|------------------|------|----------------------------------------|----|---|-------|-------|--------------------|-----------|------------|--------------------|-------------|
|           |                  |      | 1                                      | 2  | 3 |       |       |                    |           |            |                    |             |
|           |                  |      |                                        |    |   |       |       |                    |           |            |                    |             |
| 2         | 87,5             | 974  | 68                                     | 1  | 0 | -0,94 | -0,97 | 1,014±0,01         | 0,029     | 1,58       | 0,91               | (0,00-1,74) |
|           | 75,0             | 1551 | 81                                     | 6  | 0 | 1,95  | 2,06  | 1,069±0,03         | 0,135     | 1,42       | 2,28               | (0,86-3,13) |
|           | 50,0             | 1322 | 50                                     | 3  | 0 | 1,70  | 1,74  | 1,057±0,03         | 0,111     | 1,15       | 2,04               | (0,00-3,08) |
|           | 25,0             | 1516 | 31                                     | 3  | 0 | 3,86  | 3,88  | 1,088±0,05         | 0,172     | 0,82       | 2,60               | (0,00-3,89) |
|           | 12,5             | 1322 | 14                                     | 1  | 0 | 3,02  | 2,93  | 1,067±0,07         | 0,130     | 0,51       | 2,23               | (0,00-3,98) |
| 3         | 87,5             | 849  | 113                                    | 12 | 0 | 0,31  | 0,52  | 1,096±0,03         | 0,186     | 2,52       | 2,72               | (1,70-3,46) |
|           | 75,0             | 824  | 72                                     | 7  | 0 | 1,12  | 1,37  | 1,089±0,03         | 0,172     | 1,97       | 2,61               | (1,18-3,51) |
|           | 50,0             | 1009 | 65                                     | 7  | 1 | 3,70  | 3,37  | 1,123±0,04         | 0,237     | 1,70       | 3,11               | (1,70-4,05) |
|           | 25,0             | 1070 | 23                                     | 4  | 0 | 5,41  | 5,43  | 1,148±0,08         | 0,283     | 0,91       | 3,43               | (0,00-4,87) |
|           | 12,5             | 1096 | 24                                     | 1  | 0 | 1,29  | 1,27  | 1,040±0,04         | 0,079     | 0,80       | 1,67               | (0,00-3,05) |
| 4         | 87,5             | 463  | 80                                     | 12 | 1 | 0,79  | 0,87  | 1,151±0,04         | 0,287     | 3,07       | 3,45               | (2,29-4,30) |
|           | 75,0             | 504  | 59                                     | 10 | 1 | 2,49  | 2,52  | 1,171±0,05         | 0,325     | 2,53       | 3,69               | (2,33-4,65) |
|           | 50,0             | 775  | 63                                     | 5  | 1 | 2,26  | 1,91  | 1,101±0,04         | 0,196     | 1,90       | 2,81               | (1,27-3,76) |
|           | 25,0             | 1035 | 30                                     | 5  | 0 | 4,89  | 4,89  | 1,143±0,07         | 0,273     | 1,09       | 3,36               | (0,93-4,65) |
|           | 12,5             | 1040 | 14                                     | 2  | 0 | 4,83  | 4,74  | 1,125±0,09         | 0,240     | 0,65       | 3,13               | (0,00-4,91) |
| 5         | 87,5             | 374  | 92                                     | 17 | 2 | -0,02 | 0,06  | 1,189±0,04         | 0,357     | 3,86       | 3,89               | (2,87-4,67) |
|           | 75,0             | 553  | 68                                     | 19 | 2 | 4,11  | 4,35  | 1,258±0,06         | 0,479     | 2,85       | 4,55               | (3,44-5,40) |
|           | 50,0             | 523  | 42                                     | 8  | 0 | 2,72  | 3,00  | 1,160±0,06         | 0,305     | 2,04       | 3,57               | (1,82-4,68) |
|           | 25,0             | 890  | 37                                     | 8  | 0 | 5,19  | 5,40  | 1,178±0,06         | 0,337     | 1,42       | 3,76               | (1,93-4,93) |
|           | 12,5             | 1260 | 19                                     | 4  | 0 | 7,05  | 7,03  | 1,174±0,09         | 0,330     | 0,75       | 3,72               | (0,00-5,27) |

Els valors de u i s >1,96 indiquen sobredispersió; Cel: cèl·lules analitzades. A la dosi total i parcial es mostra entre parèntesis els valors dels intervals de confiança del 95%.



### 5.1.3. Estimació de la dosi d'exposició

Després d'una exposició a irradiacions de baixa LET, la sobredispersió en la distribució d'anomalies per cèl·lula indica que es podria tractar d'una irradiació parcial i que per tant s'hauria de tenir en compte a la hora de fer l'estimació de la dosi.

A les taules 6 a 13 s'hi pot veure la dosi estimada considerant l'exposició com a total i com a parcial. En les figures de la 16 a la 23 hi ha la representació gràfica d'aquests resultats per a les 8 alteracions considerades.

Quan es considera la irradiació com a total, s'observa com la dosi estimada disminueix a mida que disminueix el percentatge de sang irradiada. En canvi, la dosi estimada considerant la irradiació com a parcial, s'ajusta molt millor a la dosi real.

L'amplitud dels intervals de confiança es deu a que amb el pintat de 3 cromosomes, la freqüència d'alteracions observada és aproximament una tercera part de la real.

Per tal de valorar quina anomalia de les considerades ofereix una millor estimació de la dosi en casos d'irradiacions parcials, es considera per un costat el nombre d'ocasions on l'interval de confiança del 95% de la dosi estimada inclou la dosi real i, d'altra banda el millor ajust entre la dosi estimada i la real utilitzant el test de la  $\chi^2$ .

Si tenim en compte per un costat el nombre de dilucions que l'interval de confiança al 95% de la dosi parcial inclou en més casos la dosi real, i per l'altre el millor ajust entre la dosi estimada i la real utilitzant el test de la  $\chi^2$ , l'alteració tipus translocació que millor resultat ofereix és el total de translocacions aparentment simples (AST). En aquest cas en 16 de les 20 dilucions, l'interval de confiança inclou la dosi real, i el valor de la  $\chi^2$  és de 5,97.

L'alteració tipus dicentric que mostra un millor ajust és el total de dicèntrics aparentment simples (ASD) ( $\chi^2 = 3,86$ ), on en 19 de les 20 dilucions l'interval de confiança inclou la dosi real.

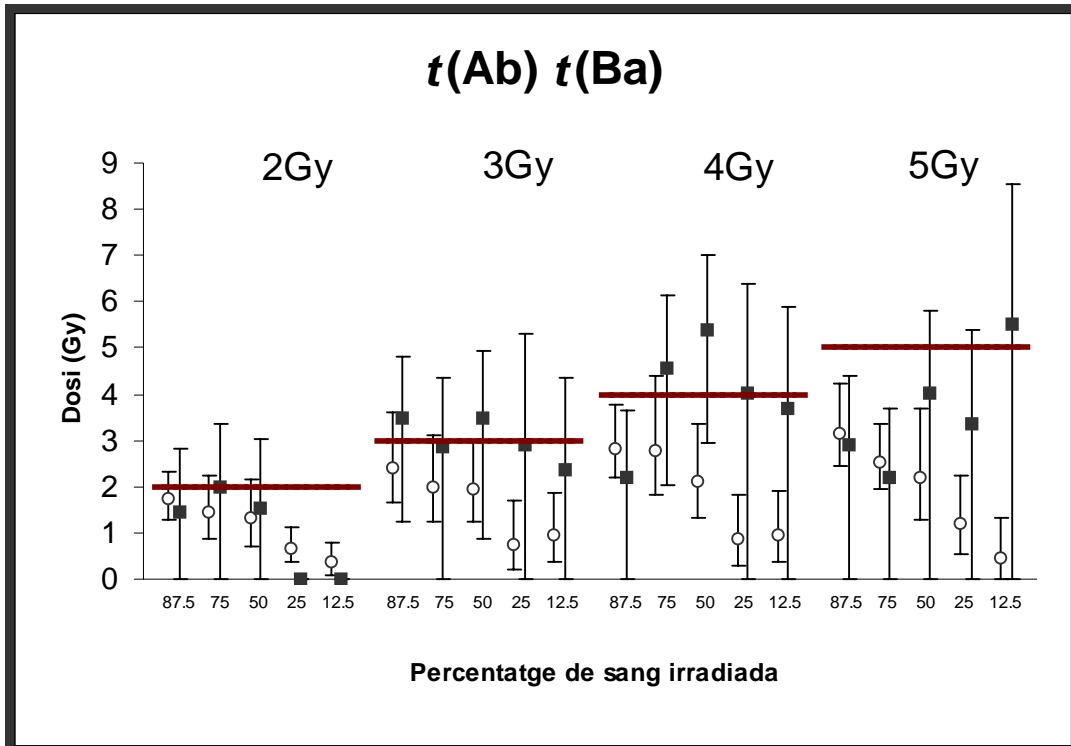


Figura 16.- Dosis estimades per les translocacions aparentment simples completes ( $t(Ab)$   $t(Ba)$ )  $\pm$  interval de confiança del 95% (barres verticals). Amb cercles buits i amb quadrats plens es representen les dosis estimades considerant la irradiació com a total i com a parcial respectivament. La dosi real està representada amb línies horitzontals.

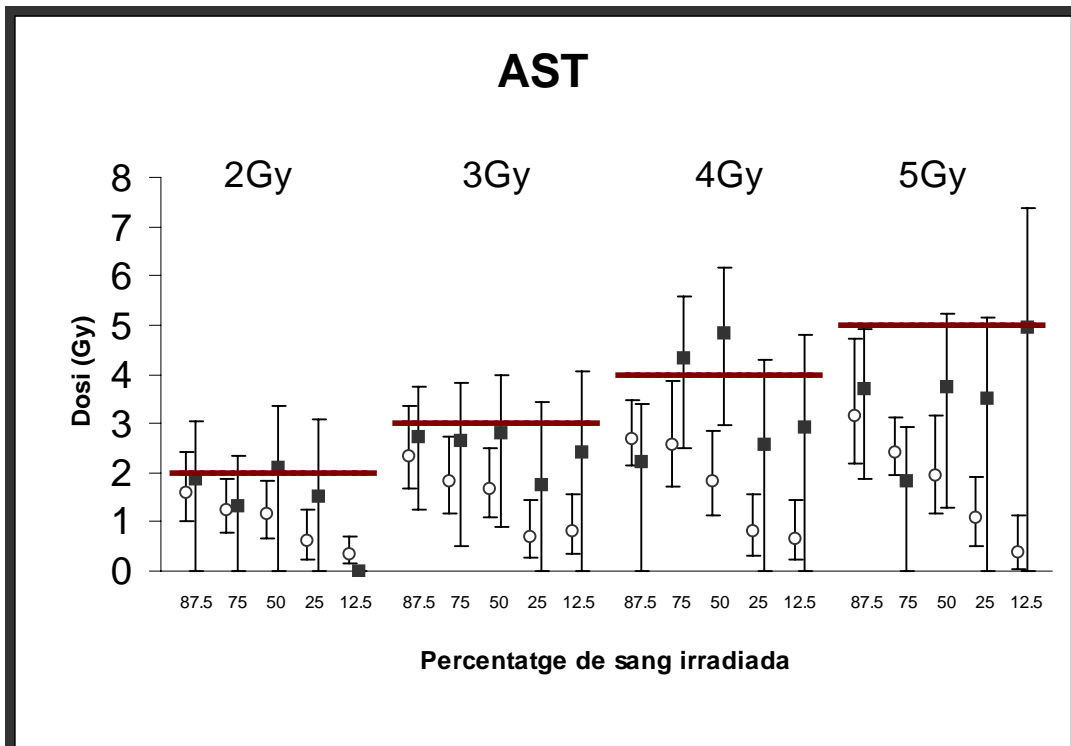


Figura 17.- Dosis estimades pel total de translocacions aparentment simples (AST)  $\pm$  interval de confiança del 95% (barres verticals). Amb cercles buits i amb quadrats plens es representen les dosis estimades considerant la irradiació com a total i com a parcial respectivament. La dosi real està representada amb línies horitzontals.

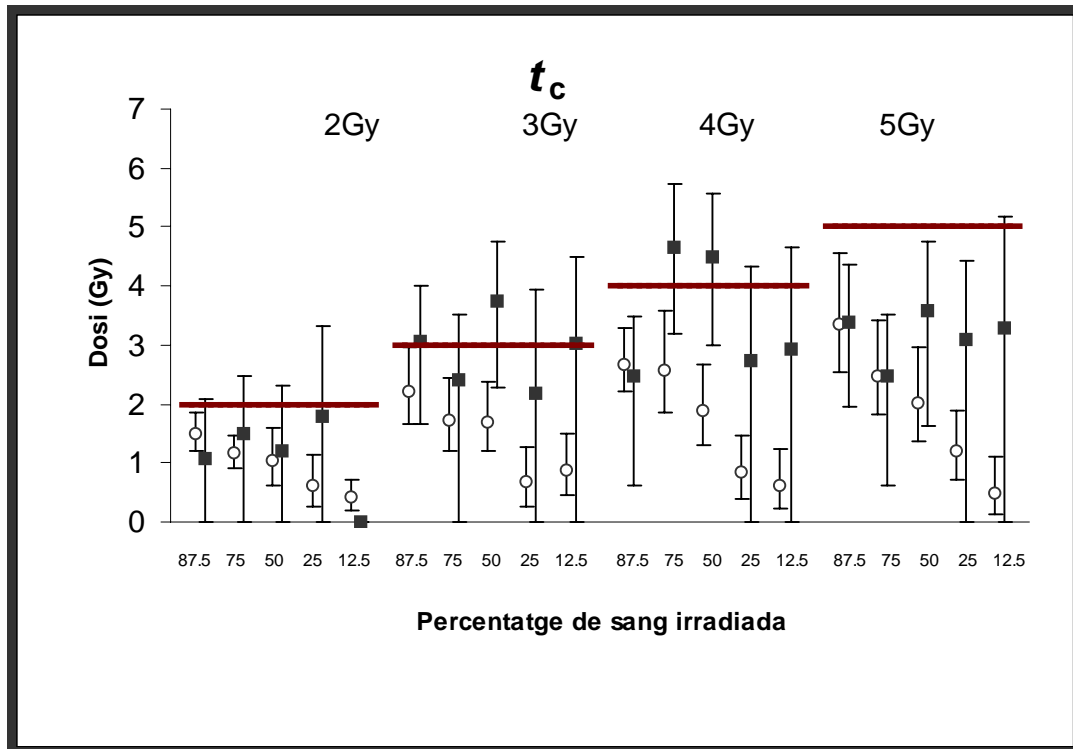


Figura 18.- Dosis estimades per les translocacions completes ( $t_c$ )  $\pm$  interval de confiança del 95% (barres verticals). Amb cercles buits i amb quadrats plens es representen les dosis estimades considerant la irradiació com a total i com a parcial respectivament. La dosi real està representada amb línies horitzontals.

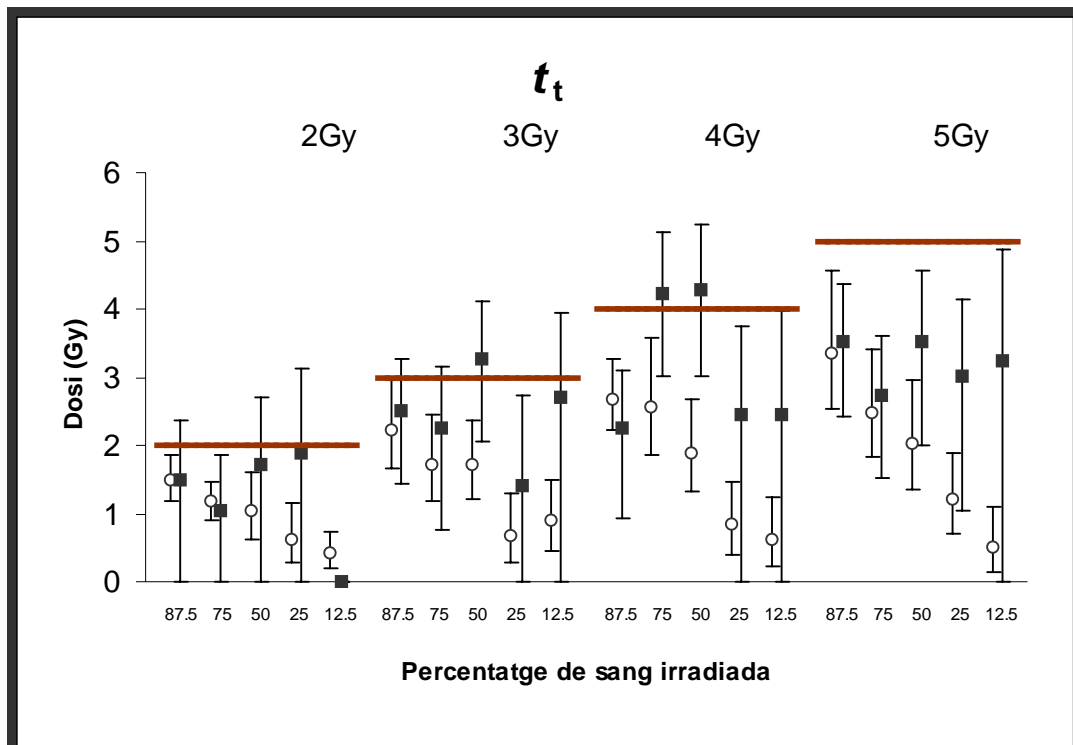


Figura 19.- Dosis estimades per les translocacions totals ( $t_t$ )  $\pm$  interval de confiança del 95% (barres verticals). Amb cercles buits i amb quadrats plens es representen les dosis estimades considerant la irradiació com a total i com a parcial respectivament. La dosi real està representada amb línies horitzontals.

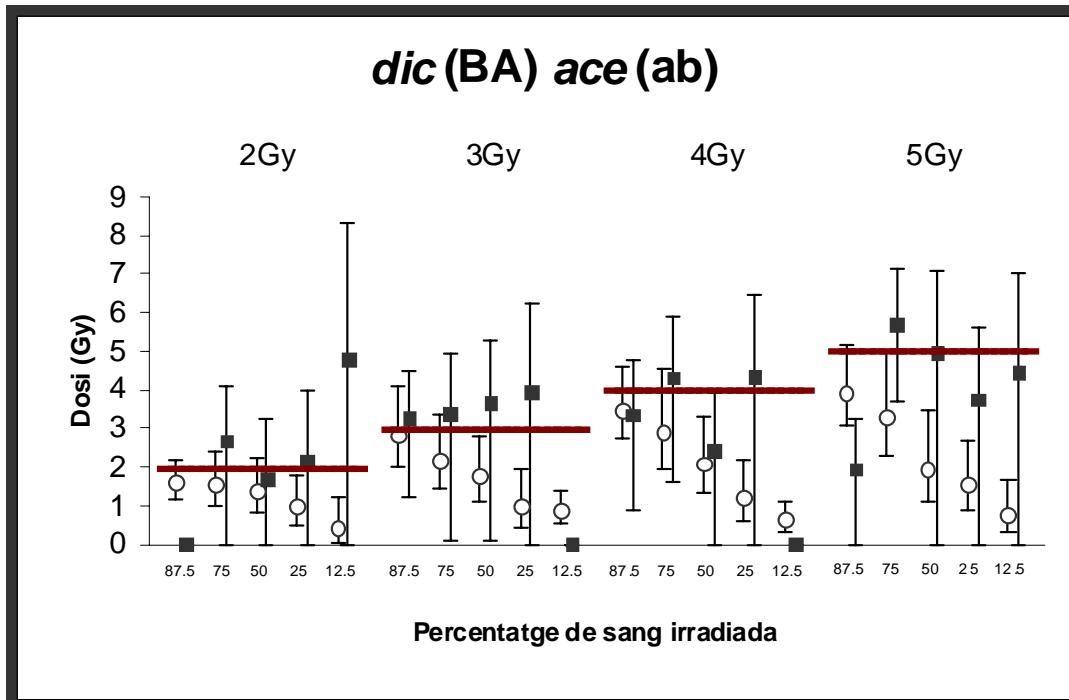


Figura 20.- Dosis estimades pels dicèntrics aparentment simples complets (*dic*(BA) *ace*(ab)) ± interval de confiança del 95% (barres verticals). Amb cercles buits i amb quadrats plens es representen les dosis estimades considerant la irradiació com a total i com a parcial respectivament. La dosi real està representada amb línies horitzontals.

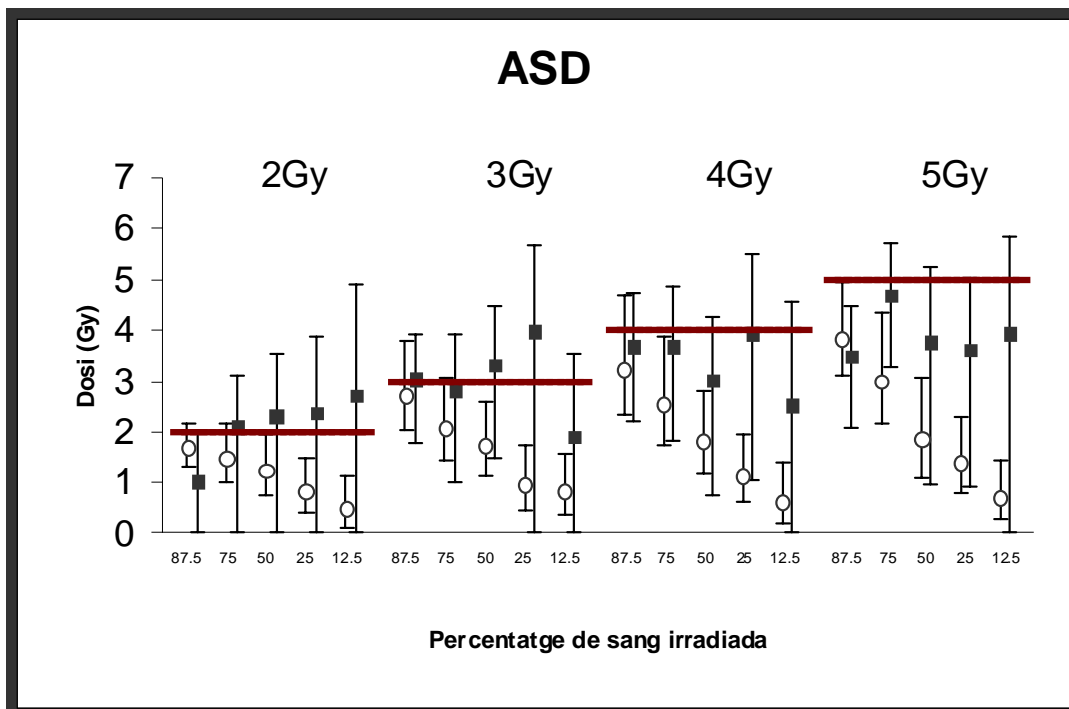


Figura 21.- Dosis estimades pel total de dicèntrics aparentment simples (ASD) ± interval de confiança del 95% (barres verticals). Amb cercles buits i amb quadrats plens es representen les dosis estimades considerant la irradiació com a total i com a parcial respectivament. La dosi real està representada amb línies horitzontals.

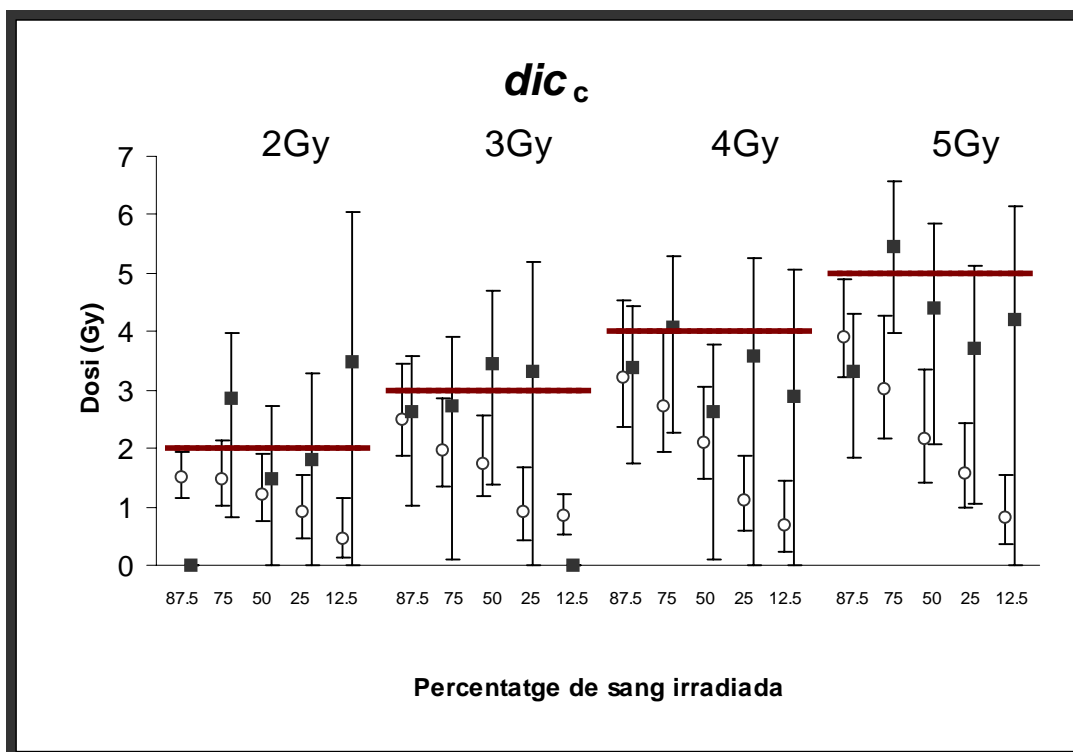


Figura 22.- Dosis estimades pels dicèntrics complets ( $dic_c$ )  $\pm$  interval de confiança del 95% (barres verticals). Amb cercles buits i amb quadrats plens es representen les dosis estimades considerant la irradiació com a total i com a parcial respectivament. La dosi real està representada amb línies horitzontals.

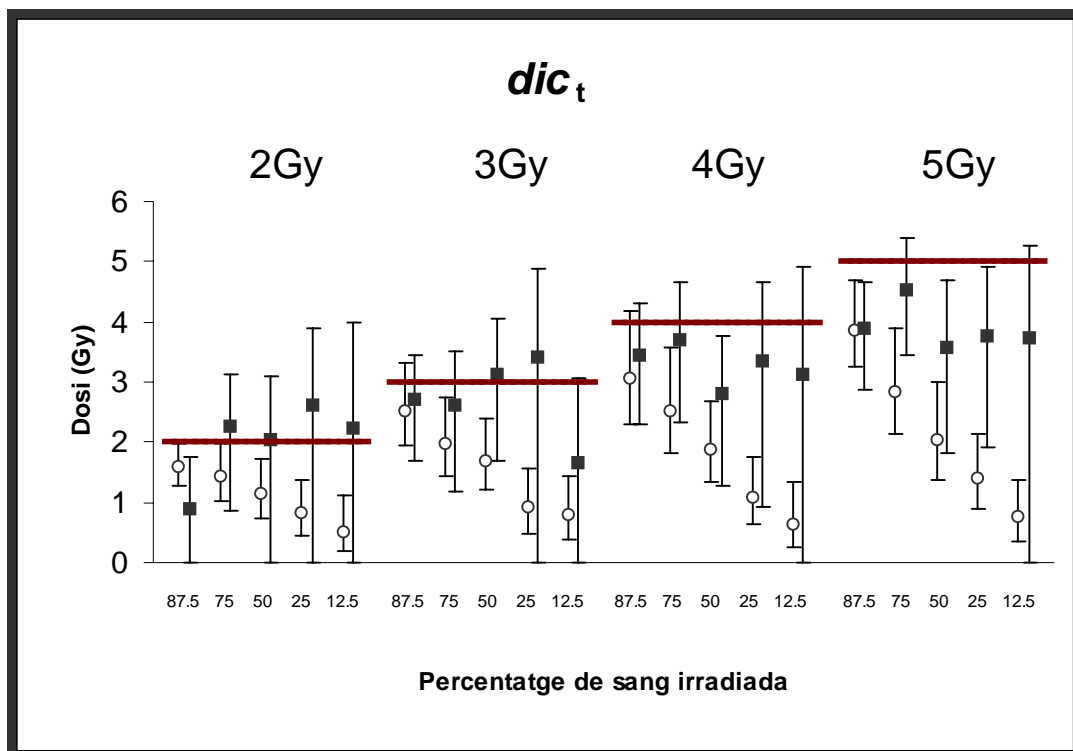


Figura 23.- Dosis estimades pels dicèntrics totals ( $dic_t$ )  $\pm$  interval de confiança del 95% (barres verticals). Amb cercles buits i amb quadrats plens es representen les dosis estimades considerant la irradiació com a total i com a parcial respectivament. La dosi real està representada amb línies horitzontals.

### 5.1.4. Anàlisi de cèl·lules estables

Després d'una irradiació parcial, la pèrdua de cèl·lules que contenen alteracions cromosòmiques inestables al llarg del temps, podria afectar a la freqüència de translocacions (Guerrero-Carbajal 1998). Per aquesta raó s'ha realitzat el càlcul dels tests  $u$  i  $s$ , i l'estimació de la dosi pel total de les translocacions aparentment simples considerant només cèl·lules sense alteracions inestables, és a dir sense dicèntrics, ni acèntrics ni anells (taula 14). S'ha detectat sobredispersió en dues dilucions dels cultius irradiats a 2 i 3 Gy, en quatre dilucions en el cultiu irradiat a 4 Gy però en cap dilució del cultiu irradiat a 5 Gy. Quan l'estimació de la dosi es realitza considerant la irradiació com a total, aquesta sempre és menor que quan és calcula considerant la irradiació com a parcial (figura 24). Aquesta diferència és més notable com més gran és la dosi. Les dosis estimades fent servir el mètode Dolphin en cèl·lules que no contenen alteracions inestables coincideixen força bé amb la dosi real en 13 de les 20 dilucions, mentre que en 7 dilucions la dosi no es va poder estimar perquè no hi havia cèl·lules amb 2 o més alteracions. Al cultiu irradiat a 5 Gy només es va poder estimar la dosi en la dilució de 87,5%.

Taula 14: Informació detallada del total de AST, pel total de cèl·lules i per cèl·lules sense alteracions inestables.

| Dosi (Gy) | % sang irradiada | Cèl·lules | Distribució de les alteracions per cèl·lula |   |       | $u$   | $s$             | $X/(N-n_0) \pm SE$ | $\lambda$ | Dosi total (Gy) | Dosi parcial (Gy) (interval 95%) |  |
|-----------|------------------|-----------|---------------------------------------------|---|-------|-------|-----------------|--------------------|-----------|-----------------|----------------------------------|--|
|           |                  |           | 1                                           | 2 | 3     |       |                 |                    |           |                 |                                  |  |
| 2         | 87,5             | 673       | 39                                          | 2 | 0,57  | 0,59  | $1,05 \pm 0,10$ | 0,10               | 1,50      | 1,98            | (0 ; 3,40)                       |  |
|           | 75,0             | 1227      | 38                                          | 1 | 0,46  | 0,45  | $1,03 \pm 0,03$ | 0,05               | 0,91      | 1,27            | (0 ; 2,62)                       |  |
|           | 50,0             | 1131      | 31                                          | 2 | 2,03  | 2,04  | $1,06 \pm 0,04$ | 0,12               | 0,87      | 2,28            | (0 ; 3,84)                       |  |
|           | 25,0             | 1427      | 17                                          | 1 | 2,54  | 2,49  | $1,06 \pm 0,06$ | 0,11               | 0,40      | 2,15            | (0 ; 4,13)                       |  |
|           | 12,5             | 1274      | 13                                          |   | -0,25 | -0,26 | 1               | 0,00               | 0,30      | 0               | (0 ; 0)                          |  |
| 3         | 87,5             | 530       | 39                                          | 3 | 0,83  | 0,89  | $1,07 \pm 0,04$ | 0,14               | 1,82      | 2,52            | (0 ; 3,95)                       |  |
|           | 75,0             | 564       | 26                                          | 2 | 1,40  | 1,42  | $1,07 \pm 0,05$ | 0,14               | 1,32      | 2,52            | (0 ; 4,21)                       |  |
|           | 50,0             | 850       | 27                                          | 3 | 3,02  | 3,06  | $1,10 \pm 0,06$ | 0,19               | 1,04      | 3,09            | (0 ; 4,77)                       |  |
|           | 25,0             | 980       | 10                                          |   | -0,21 | -0,23 | 1               | 0,00               | 0,30      | 0               | (0 ; 0)                          |  |
|           | 12,5             | 1049      | 14                                          | 1 | 2,62  | 2,55  | $1,07 \pm 0,07$ | 0,13               | 0,46      | 2,42            | (0 ; 4,57)                       |  |
| 4         | 87,5             | 195       | 12                                          | 0 | -0,58 | -0,63 | 1               | 0,00               | 1,46      | -               | (0 ; 0)                          |  |
|           | 75,0             | 274       | 10                                          | 2 | 2,90  | 2,88  | $1,170,12$      | 0,32               | 1,28      | 4,14            | (0 ; 6,62)                       |  |
|           | 50,0             | 571       | 10                                          | 2 | 4,61  | 4,51  | $1,17 0,12$     | 0,32               | 0,72      | 4,14            | (0 ; 6,62)                       |  |
|           | 25,0             | 923       | 9                                           | 1 | 3,85  | 3,69  | $1,10 0,10$     | 0,19               | 0,36      | 3,09            | (0 ; 5,68)                       |  |
|           | 12,5             | 965       | 5                                           | 1 | 6,63  | 6,15  | $1,17 0,17$     | 0,32               | 0,19      | 4,14            | (0 ; 7,37)                       |  |
| 5         | 87,5             | 107       | 7                                           | 1 | 1,15  | 1,10  | $1,12 0,13$     | 0,24               | 1,81      | 3,52            | (0 ; 6,39)                       |  |
|           | 75,0             | 389       | 6                                           |   | -0,20 | -0,22 | 1               | 0,00               | 0,47      | 0               | (0 ; 0)                          |  |
|           | 50,0             | 424       | 4                                           |   | -0,12 | -0,14 | 1               | 0,00               | 0,27      | 0               | (0 ; 0)                          |  |
|           | 25,0             | 828       | 3                                           |   | -0,06 | -0,07 | 1               | 0,00               | 0,04      | 0               | (0 ; 0)                          |  |
|           | 12,5             | 1216      | 1                                           |   | -     | -0,02 | 1               | 0,00               | 0         | 0               | (0 ; 0)                          |  |

$\lambda$ , freqüència de les alteracions en la fracció irradiada.  $X/(N-n_0)$ , coeficient entre alteracions cromosòmiques i cèl·lules amb alteracions. Per les estimacions de la dosi es varen fer servir el següents coeficients:  $C=0.27 \pm 0.05 (10^{-2})$ ,  $\alpha=2.09 \pm 0.34 (10^{-2} \text{ Gy}^{-1})$   $\beta=1.32 \pm 0.18 (10^{-2} \text{ Gy}^{-2})$ .

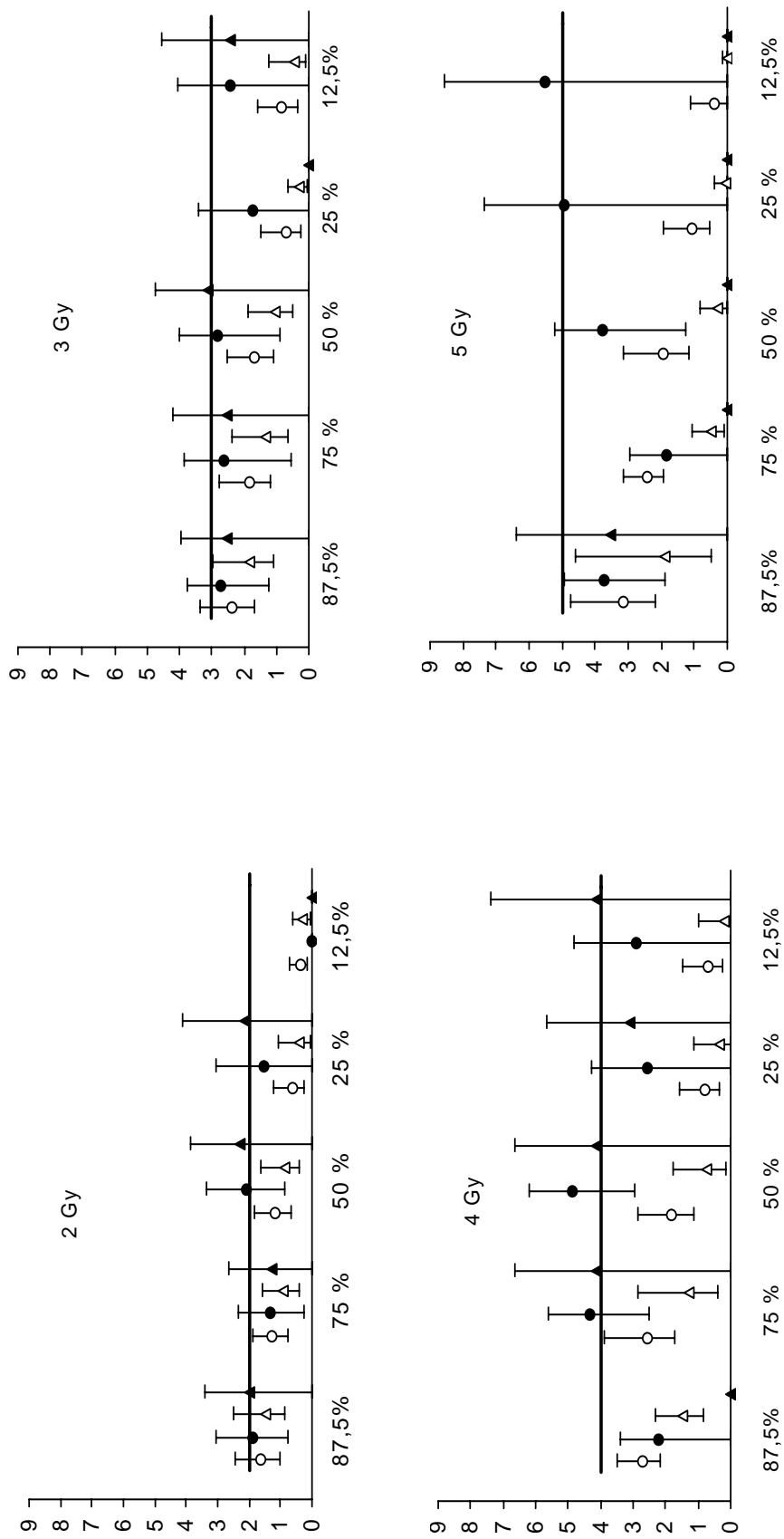


Fig 24.- Dosi estimada en Gy per les AST. Estimació de la dosis amb el intervals de confiança del 95% tenint em compte totes les cèl·lules analitzades considerant la irradiació com a total (○) i com a parcial (●). Estimació de la dosis amb el intervals de confiança del 95% tenint en compte només les cèl·lules sense alteracions inestables, considerant la irradiació com a total (Δ) i com a parcial (▲).

## 5.2. Persistència de les alteracions cromosòmiques a llarg termini

### 5.2.1. Estudi preliminar

Prèviament a l'estudi del seguiment de les alteracions cromosòmiques radioinduides, es va fer un estudi control amb les cèl·lules Jurkat, per tal de comprovar l'estabilitat de la línia.

Primer es va comprovar amb tinció uniforme que el cultiu presentés una única població cel·lular estable de  $2n = 46$ . Un cop realitzada la comprovació, es va realitzar l'estudi de 2.104 metafases a diferents generacions d'un cultiu no irradiat pintant mitjançant FISH els cromosomes 1, 4 i 11. En aquest estudi no es va observar cap alteració cromosòmica que impliqués els diferents cromosomes pintats.

### 5.2.2. Estudi amb FISH painting

En l'estudi citogenètic aplicant la tècnica de FISH painting s'ha realitzat en un control no irradiat i en mostres irradiades a 0,2, 2 i 4 Gy, s'ha analitzat un mínim de 500 cèl·lules per mostra, i un total de 13.744 cèl·lules. Els resultats més destacats es mostren a les figures de la 25 a la 27 que corresponen a la variació, al llarg del temps després de la irradiació, de les freqüències  $\pm$  SE ( $\times 100$ ) de les translocacions aparentment simples (AST), els dicèntrics aparentment simples (ASD) i les alteracions complexes respectivament.

El cultiu irradiat a 0,2 Gy mostra molt poques alteracions cromosòmiques 48h després de la irradiació (primera mostra), i si es compara amb els resultats obtinguts en el cultiu control no s'observen diferències significatives, la freqüència  $\pm$  SE ( $\times 100$ ) de les AST va ser de  $0,20 \pm 0,20$  en cultiu control i de  $0,32 \pm 0,18$  en el cultiu irradiat a 0,2 Gy, mentre que pels ASD les freqüències van ser 0 i  $0,64 \pm 0,26$  respectivament. El cultiu control no mostrava cap alteració cromosòmica complexa en cap mostra, mentre que el cultiu irradiat a 0,2 Gy en va mostrar només 2.



En el cultiu irradiat a 2 Gy la freqüència  $\pm$  SE ( $\times 100$ ) en la primera mostra analitzada va ser  $6,41 \pm 1,12$  per AST,  $7,38 \pm 1,20$  per ASD i  $1,75 \pm 0,58$  per les alteracions complexes, totes elles significativament diferents ( $p < 0,01$ , t-student) a les del cultiu control. Per aquesta dosi la freqüència de les AST roman pràcticament invariable fins a final del cultiu ( $5,77 \pm 0,74$ ), mentre que la freqüència de les ASD i de les alteracions complexes disminueixen de forma progressiva al llarg del temps fins a assolir valors propers a zero a les 192 h. Al cultiu irradiat a 4 Gy la freqüència de les AST mostra un descens acusat des de  $17,28 \pm 1,89$  en la primera mostra fins a  $6,21 \pm 1,10$  a 216 h, i a partir d'aquest temps el descens és poc acusat però progressiu fins una freqüència de  $3,53 \pm 0,49$  corresponent a la darrera mostra del cultiu (496 h). Els ASD i les alteracions complexes al inici del cultiu mostren una freqüència de  $17,08 \pm 1,87$  i  $8,02 \pm 1,28$  respectivament, i a les 216 h ja assoleixen valors propers a zero que ja romandran invariables fins al final dels cultius.

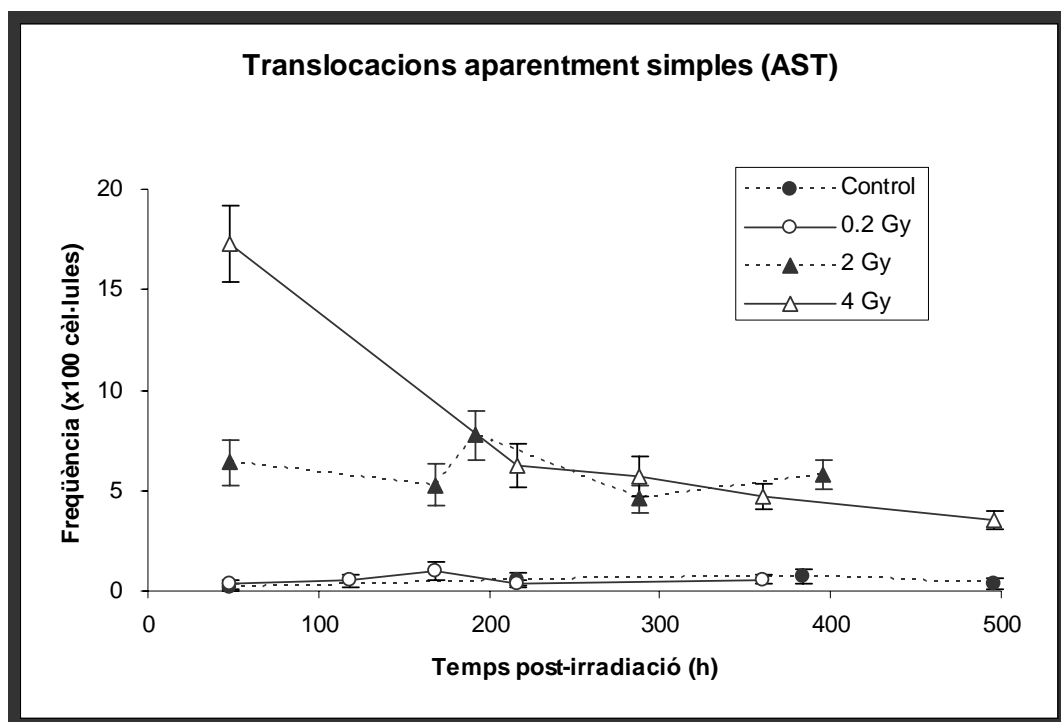


Figura 25. Freqüències de translocacions aparentment simples (AST) del cultiu control (cercles plens, línia discontinua) i dels cultius irradiats a 0,2 (cercles buits, línia contínua), 2 (triangles plens, línia discontinua), i 4 Gy (triangles buits, línia contínua). Els errors estàndard (SE) es van calcular assumint que les anomalies segueixen la distribució de Poisson.

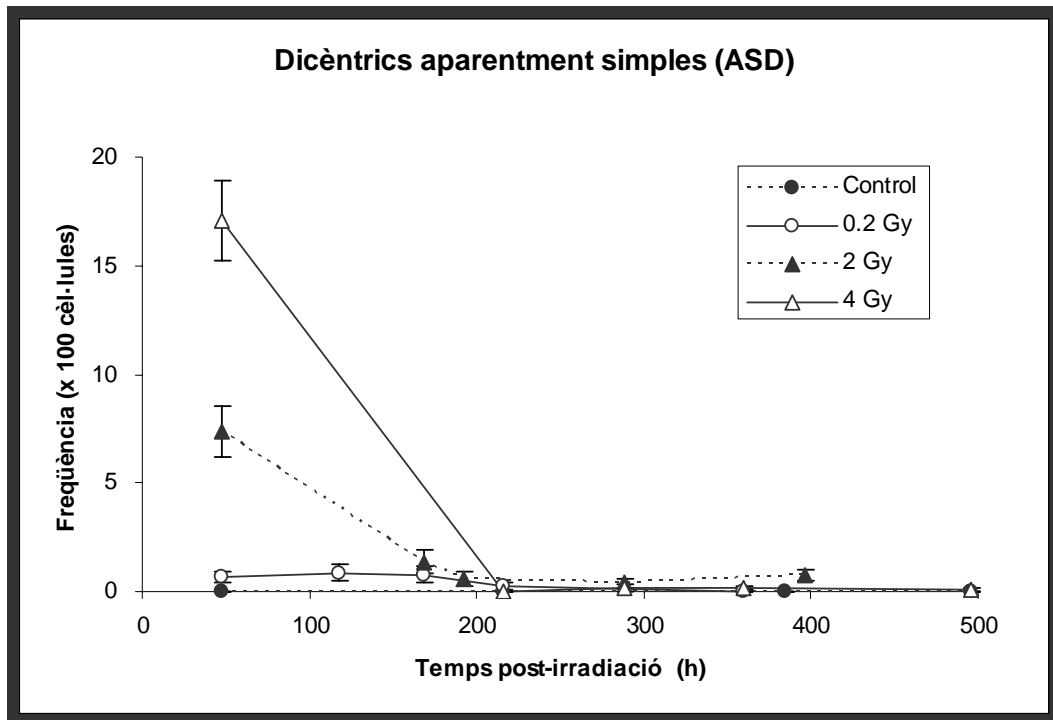


Figura 26. Freqüències de dicèntrics aparentment simples (ASD) del cultiu control (cercles plens, línia discontinua) i dels cultius irradiats a 0,2 (cercles buits, línia continua), 2 (triangles plens, línia discontinua), i 4 Gy (triangles buits, línia continua). Els errors estàndard (SE) es van calcular assumint que les anomalies seguien la distribució de Poisson.

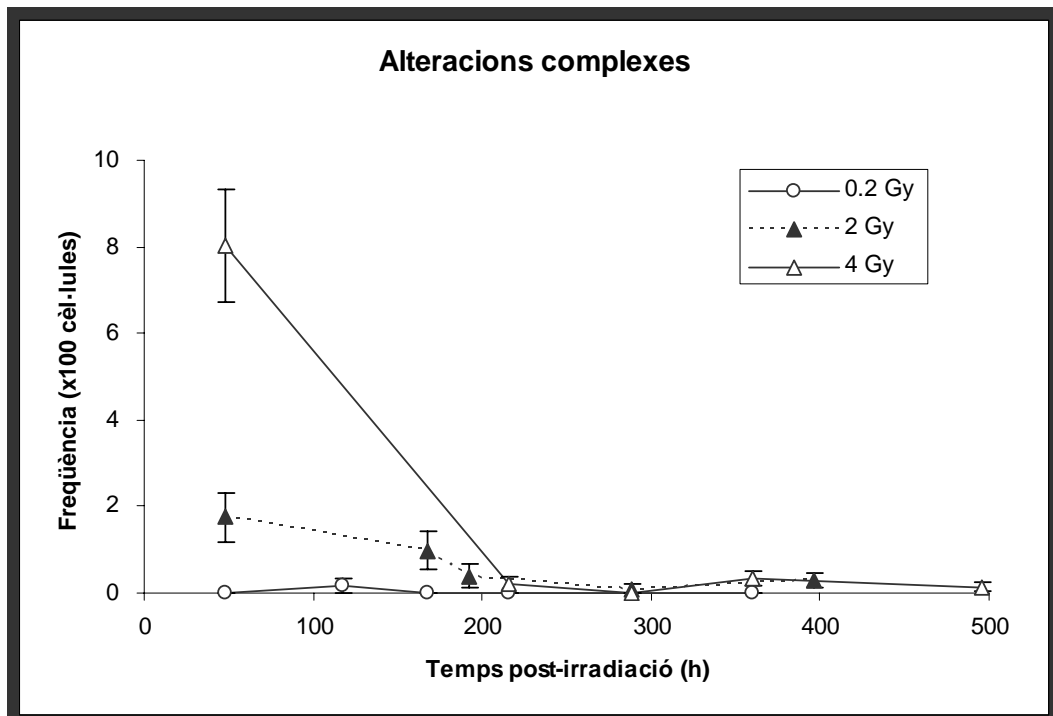


Figura 27. Freqüències de les alteracions complexes dels cultius irradiats a 0,2 (cercles buits, línia continua), 2 (triangles plens, línia discontinua), i 4 Gy (triangles buits, línia continua). Els errors estàndard (SE) es van calcular assumint que les anomalies seguien la distribució de Poisson.

### 5.2.3. Estudi amb mFISH

#### 5.2.3.1. Resultats citogenètics

A la taula 15 es poden observar les alteracions cromosòmiques detectades amb mFISH en la mostra inicial (48h després de la irradiació) i en la mostra final (darrera mostra de cada cultiu) del cultiu control i dels cultius irradiats a 2 i 4 Gy. Es van analitzar un total de 615 cèl·lules. La taula mostra el percentatge de cèl·lules amb alteracions cromosòmiques i les freqüències de les alteracions observades. Les alteracions tipus no intercanvi més induïdes són les delecions terminals verdaderes (TTD) amb freqüències de 0,70 als 2 Gy i de 0,82 als 4 Gy. En la mostra final les TTD assoleixen freqüències similars a la dels cultius control. De les alteracions tipus no intercanvi només les LTChr són potencialment estables, i són les que presenten una freqüència més elevada en la mostra final dels cultius irradiats.

Les alteracions tipus intercanvi es poden classificar en simples o complexes. Les alteracions simples poden ser de tipus dicèntric o translocació. Les translocacions completes i “one-way” mostren una certa estabilitat al llarg del temps. Per contra les translocacions incompletes només s’han observat en la mostra inicial i no en la final. En relació a la dosi, en el cultiu irradiat a 2 Gy la freqüència de translocacions de la mostra final és similar a la de la mostra inicial, mentre que en el cultiu irradiat a 4 Gy la freqüència davalla clarament. Si s’exclouen les translocacions incompletes, a 2 Gy la freqüència és de  $0,24 \pm 0,03$  al inici del cultiu i de  $0,39 \pm 0,07$  al final del cultiu. En canvi el cultiu irradiat a 4 Gy la freqüència inicial és  $0,40 \pm 0,07$  mentre que la freqüència final és  $0,15 \pm 0,03$ . Els cromosomes dicèntrics desapareixen al final del cultiu a totes les dosis. Si bé, dicèntrics i translocacions s’haurien d’incloure teòricament amb la mateixa freqüència, en el cas del cultiu irradiat a 2 Gy les translocacions mostren una freqüència menor que els dicèntrics, en canvi en el cultiu irradiat a 4 Gy translocacions i dicèntrics mostren freqüències similars. Les alteracions complexes mostren el mateix comportament que els dicèntrics, desapareixent al llarg del temps post-irradiació.

Taula 15. Alteracions cromosòmiques observades amb mFISH.

|                                        | Control inicial         | Control final           | 2Gy inicial               | 2Gy final                | 4Gy inicial              | 4Gy final                |
|----------------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Cèl·lules analitzades                  | 101                     | 84                      | 152                       | 83                       | 71                       | 124                      |
| Cèl·lules alterades (%)                | 4%                      | 8%                      | 63%                       | 28%                      | 76%                      | 17%                      |
| <b>ALTERACIONS TIPUS NO INTERCANVI</b> |                         |                         |                           |                          |                          |                          |
| TTD                                    | 2<br>(0,02±0,01)        | 2<br>(0,02±0,02)        | 107<br>(0,70±0,07)        | 0                        | 58<br>(0,82±0,11)        | 2<br>(0,02±0,01)         |
| LTChr                                  | 1<br>(0,01±0,01)        | 1<br>(0,01±0,01)        | 19<br>(0,13±0,03)         | 2<br>(0,02±0,02)         | 6<br>(0,08±0,03)         | 5<br>(0,04±0,02)         |
| LLAF                                   | 0                       | 2<br>(0,02±0,02)        | 18<br>(0,12±0,03)         | 0                        | 12<br>(0,17±0,05)        | 2<br>(0,02±0,01)         |
| <i>Total</i>                           | <i>3</i><br>(0,03±0,02) | <i>5</i><br>(0,06±0,03) | <i>144</i><br>(0,95±0,08) | <i>2</i><br>(0,02±0,02)  | <i>76</i><br>(1,07±0,12) | <i>9</i><br>(0,07±0,02)  |
| <b>ALTERACIONS TIPUS INTERCANVI</b>    |                         |                         |                           |                          |                          |                          |
| Translocacions simples                 |                         |                         |                           |                          |                          |                          |
| completes                              | 0                       | 0                       | 16<br>(0,11±0,03)         | 17<br>(0,20±0,05)        | 18<br>(0,25±0,06)        | 11<br>(0,09±0,03)        |
| incompletes                            | 0                       | 0                       | 14<br>(0,09±0,02)         | 0                        | 6<br>(0,08±0,03)         | 0                        |
| “one-way”                              | 0                       | 0                       | 20<br>(0,13±0,03)         | 7<br>(0,08±0,03)         | 10<br>(0,14±0,04)        | 7<br>(0,06±0,02)         |
| <i>Total</i>                           | <i>0</i>                | <i>0</i>                | <i>50</i><br>(0,33±0,05)  | <i>24</i><br>(0,29±0,06) | <i>34</i><br>(0,48±0,08) | <i>18</i><br>(0,15±0,03) |
| Dicèntrics simples                     |                         |                         |                           |                          |                          |                          |
| completes                              | 0                       | 0                       | 8<br>(0,05±0,02)          | 0                        | 16<br>(0,23±0,06)        | 0                        |
| incompletes                            | 0                       | 0                       | 4<br>(0,03±0,01)          | 0                        | 5<br>(0,07±0,03)         | 0                        |
| “one-way”                              | 1<br>(0,01±0,01)        | 2<br>(0,02±0,02)        | 17<br>(0,11±0,03)         | 2<br>(0,02±0,02)         | 8<br>(0,11±0,04)         | 0                        |
| <i>Total</i>                           | <i>1</i><br>(0,01±0,01) | <i>2</i><br>(0,02±0,02) | <i>29</i><br>(0,19±0,04)  | <i>2</i><br>(0,02±0,02)  | <i>29</i><br>(0,41±0,08) | <i>0</i>                 |
| <i>Total Simples</i>                   | <i>1</i><br>(0,01±0,01) | <i>2</i><br>(0,02±0,02) | <i>79</i><br>(0,52±0,06)  | <i>26</i><br>(0,31±0,06) | <i>63</i><br>(0,89±0,11) | <i>18</i><br>(0,15±0,03) |
| <i>Alteracions Complexes</i>           | <i>0</i>                | <i>0</i>                | <i>36</i><br>(0,24±0,04)  | <i>2</i><br>(0,02±0,02)  | <i>31</i><br>(0,44±0,08) | <i>1</i><br>(0,01±0,01)  |

TTD: Delecions terminals reals. LTChr: Cromosoma truncat aïllat. LLAF: Fragment acentric aïllat. Les freqüències i els errors estàndard (SE) es mostren entre parèntesis.

A la taula 16 s'observen les alteracions cromosòmiques detectades amb la tècnica d'mFISH en cèl·lules estables. Les alteracions que poden contenir les cèl·lules alterades estables són els cromosomes truncats aïllats (LTChr), les translocacions completes, les translocacions "one-way" i les translocacions complexes. La freqüència dels LTChr tendeix a disminuir entre la mostra inicial i la final. La freqüència de translocacions completes més "one-way" augmenta lleugerament a mida que evoluciona el cultiu de 2 Gy mentre que en el cultiu de 4 Gy disminueix lleugerament. La freqüència d'alteracions complexes estables és molt baixa en totes les mostres analitzades.

Taula 16. Alteracions cromosòmiques observades en cèl·lules estables mitjançant mFISH.

|                                         | 2Gy inicial                     | 2Gy final                       | 4Gy inicial                    | 4Gy final                       |
|-----------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Cèl·lules estables                      | 71                              | 81                              | 23                             | 120                             |
| Cèl·lules estables amb alteracions      | 15                              | 21                              | 6                              | 17                              |
| LTChr                                   | 7<br>(0,10±0,04)                | 2<br>(0,02±0,02)                | 2<br>(0,09±0,06)               | 5<br>(0,04±0,02)                |
| translocacions completes                | 6<br>(0,08±0,03)                | 17<br>(0,21±0,05)               | 3<br>(0,13±0,08)               | 11<br>(0,09±0,03)               |
| translocacions "one-way"                | 5<br>(0,07±0,03)                | 7<br>(0,09±0,03)                | 2<br>(0,09±0,06)               | 7<br>(0,06±0,02)                |
| alteracions complexes transmissibles    | 3<br>(0,04±0,02)                | 2<br>(0,02±0,02)                | 0                              | 1<br>(0,01±0,01)                |
| <i>Total alteracions transmissibles</i> | <i>21</i><br><i>(0,30±0,06)</i> | <i>28</i><br><i>(0,35±0,07)</i> | <i>7</i><br><i>(0,30±0,12)</i> | <i>24</i><br><i>(0,20±0,04)</i> |

LTChr: Cromosoma truncat aïllat. Les freqüències i errors estàndard (SE) es mostren entre parèntesis.

### 5.2.3.2. Anàlisi de les alteracions complexes

A la taula 17 es mostren els resultats de l'anàlisi de les alteracions complexes, i s'hi pot veure el nombre de trencaments de les alteracions, l'estructura de cicle, el nombre de cadascuna d'aquestes estructures de cicle i la seva freqüència acumulada en relació al nombre total de alteracions complexes. En aquestes dades s'han considerat els resultats de la mostra inicial i de la final. Si bé l'alteració amb més trencaments en té 13, tant a 2 Gy com a 4 Gy, a 2 Gy l'estructura de cicle més complexa és de grau 5, en canvi a 4 Gy és de grau 9. Així mateix el percentatge d'alteracions formades per un màxim de 6 trencaments és del 90 % a 2 Gy, mentre que a 4 Gy és d'aproximadament el

80 %. Això indica que la complexitat de les alteracions augmenta amb la dosi. En la mostra final, el nombre d'alteracions complexes és molt baix, tractant-se sempre d'alteracions complexes estables.

Taula 17. Estructura de cicle de les alteracions complexes observades amb mFISH,

| Nombre de trencaments | Estructura de cicle | Cicles a 2Gy |                      | Cicles a4Gy |                      |
|-----------------------|---------------------|--------------|----------------------|-------------|----------------------|
|                       |                     | Nombre       | Freqüència acumulada | Nombre      | Freqüència acumulada |
| <i>Mostra inicial</i> |                     |              |                      |             |                      |
| 3                     | c3                  | 17           | 0,47                 | 13          | 0,42                 |
| 4                     | c4                  | 1            |                      | 4           |                      |
|                       | c2+c2               | 6            | 0,67                 | 3           | 0,65                 |
| 5                     | c5                  |              |                      | 1           |                      |
|                       | c3+c2               | 6            | 0,83                 | 2           | 0,74                 |
| 6                     | c6                  | 1            |                      |             |                      |
|                       | c4+c2               | 2            | 0,92                 | 2           | 0,81                 |
| 7                     | c5+c2               | 1            |                      |             |                      |
|                       | c3+c2+c2            |              | 0,94                 | 1           | 0,84                 |
| 8                     | c8                  |              |                      | 1           |                      |
|                       | c4+c4               |              |                      | 1           | 0,90                 |
| 9                     | c6+c3               |              |                      | 2           |                      |
|                       | c4+c3+c2            | 1            | 0,97                 |             | 0,97                 |
| 13                    | c9+c2+c2            |              |                      | 1           |                      |
|                       | c5+c5+c3            | 1            | 1,00                 |             | 1,00                 |
| <i>Total Cicles</i>   |                     | <i>36</i>    |                      | <i>31</i>   |                      |
| <i>Mostra final</i>   |                     |              |                      |             |                      |
| 3                     | c3                  | 1            | 0,50                 | 1           | 1,00                 |
| 4                     | c2+c2               | 1            | 1,00                 |             |                      |
| <i>Total Cicles</i>   |                     | <i>2</i>     |                      | <i>1</i>    |                      |

### 5.2.3.3. Sensibilitat cromosòmica

L'mFISH permet identificar cada parell cromosòmic per tant també permet determinar els cromosomes implicats en les alteracions cromosòmiques. Utilitzant de forma conjunta les dades de 2 i 4 Gy, a les figures 28 a 30 s'hi pot veure representada la freqüència en que cada cromosoma està implicat en alteracions. A les figures també hi ha representada la freqüència esperada,

calculada tenint en compte dos models: a) considerant el contingut relatiu de DNA de cada cromosoma (Morton 1991) i b) considerant la superfície del territori que ocupa cada cromosoma en el nucli interfàsic (Cigarran *et al.* 1998).

Pel que fa a la participació de cada cromosoma en les alteracions tipus intercanvi, s'han detectat 825 trencaments en la mostra inicial (figura 28). Respecte la hipòtesi que els cromosomes es trenquen al l'atzar, globalment no s'ha observat cap desviació significativa tant si es considera el contingut de DNA ( $\chi^2 = 32,75$ ,  $p = 0,08$ ), com si es considera la superfície del territori que ocupen en el nucli interfàsic ( $\chi^2 = 34,07$ ,  $p = 0,06$ ). No obstant cal destacar que el cromosoma 7 és el que va mostrar una major desviació, estant menys involucrat de l'esperat. Quan es consideren els trencaments del total d'alteracions cromosòmiques (figura 29), es van observar desviacions significatives respecte la participació a l'atzar dels cromosomes per ambdós models ( $\chi^2 = 42,16$ ,  $p < 0,01$  model de contingut de DNA;  $\chi^2 = 64,85$ ,  $p < 0,01$  model de superfície d'àrea). Els cromosomes 7 i 16 estaven menys involucrats quan es considera el model de contingut de DNA, mentre que usant el model de la superfície del territori els cromosomes menys involucrats van ser el 7, 16, 19 i Y. L'anàlisi de la mostra final (figura 30) es va realitzar únicament amb el model de contingut de DNA i no es van observar desviacions significatives ( $\chi^2 = 28,56$ ,  $p = 0,19$ ) respecte la participació a l'atzar dels cromosomes en les alteracions cromosòmiques tipus intercanvi. És destacable que els cromosomes 7, 20 i 22 es van veure involucrats més de l'esperat.

### Implicació de cada cromosoma en les alteracions tipus intercanvi de la mostra inicial

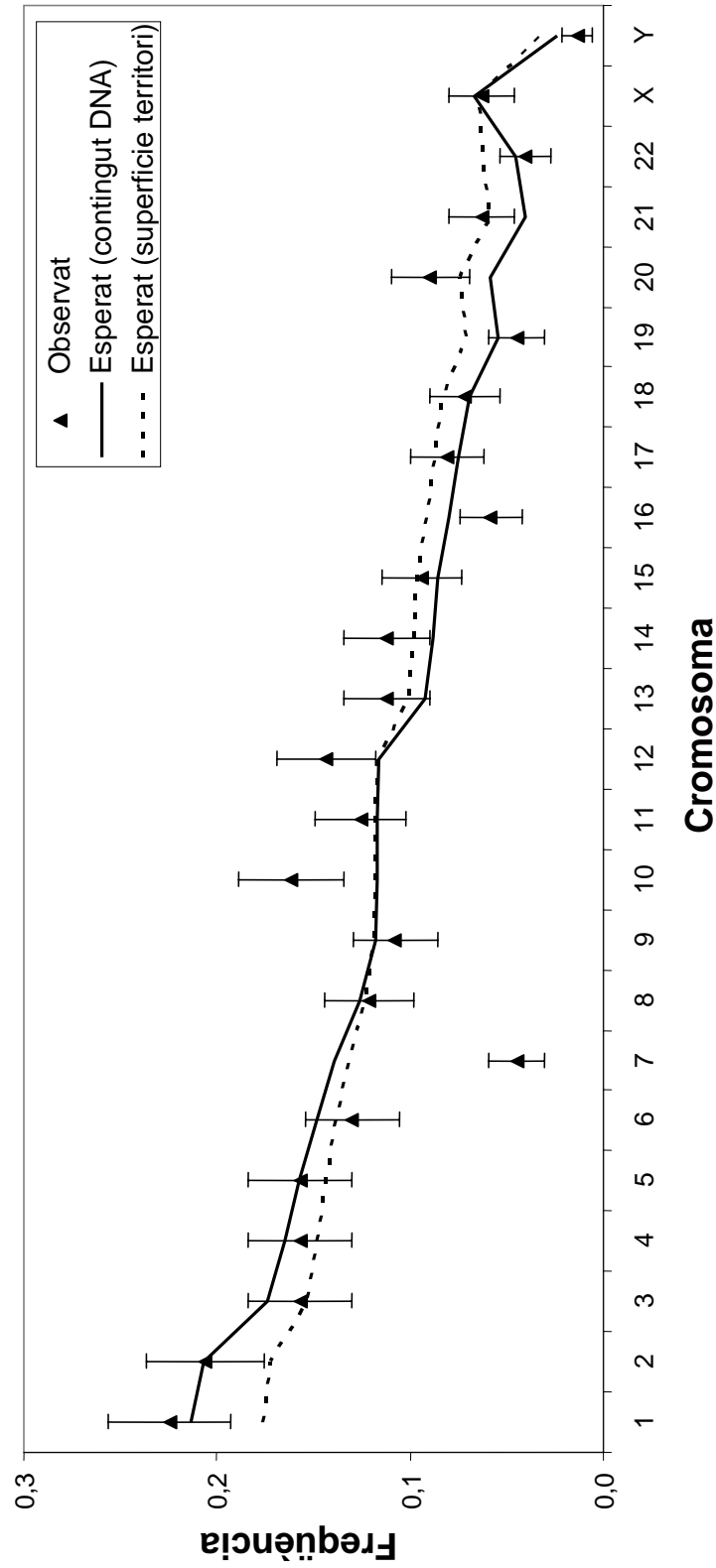


Figura 28. Freqüència observada i esperada de la implicació de cada cromosoma en alteracions cromosòmiques tipus intercanvi en la mostra inicial (2 i 4 Gy). Les freqüències esperades han estat calculades tenint en compte el contingut de DNA (línia contínua) (Morton 1991) i la superfície del territori de cada cromosoma (línia discontinua)(Cigarran et al. 1998). Les barres verticals indiquen els errors estàndards.



### Implicació de cada cromosoma en el total d'alteracions cromosòmiques de la mostra inicial

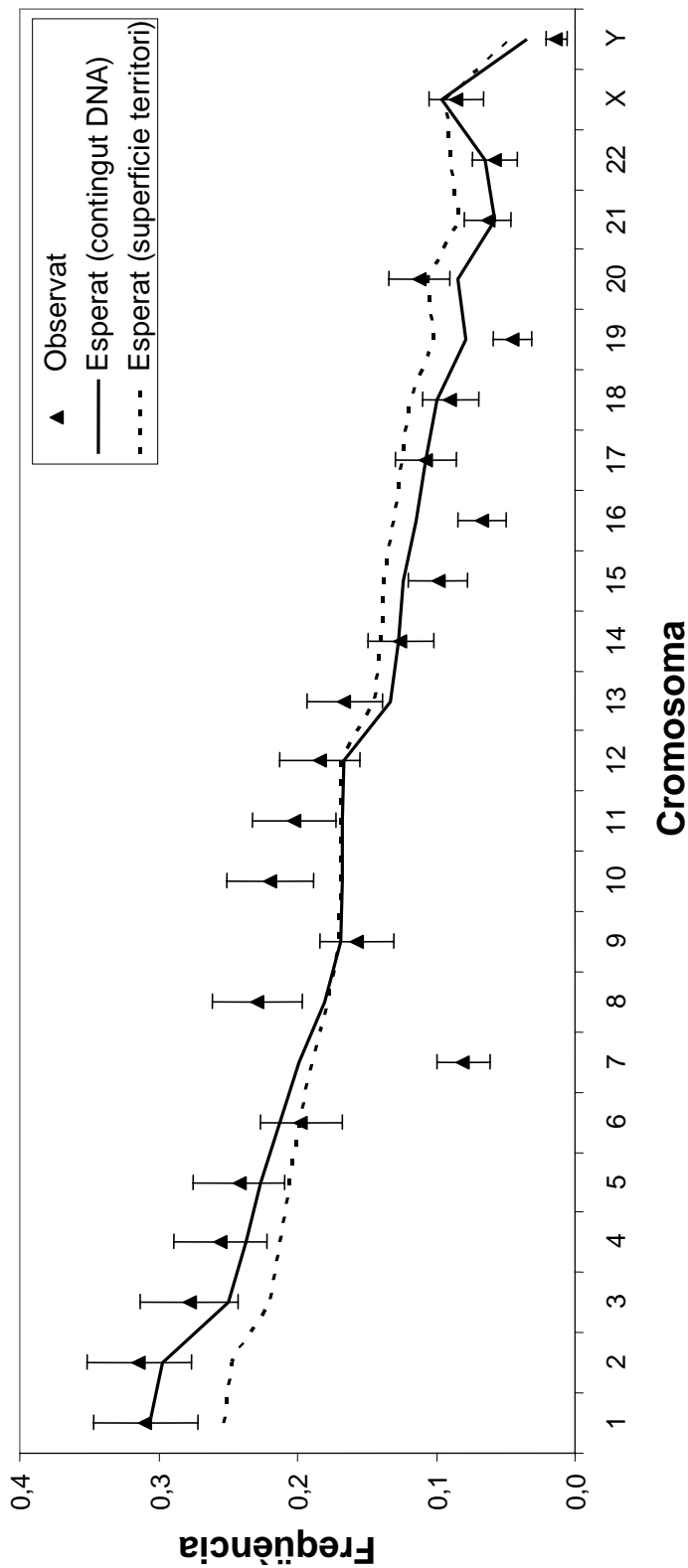


Figura 29. Frequència observada i esperada de la implicació de cada cromosoma en el total d'alteracions cromosòmiques en la mostra inicial (2 i 4 Gy). Les freqüències esperades han estat calculades tenint en compte el contingut de DNA (línia contínua) (Morton 1991) i la superfície del territori de cada cromosoma (línia discontinua)(Cigarran et al. 1998). Les barres verticals indiquen els errors estàndards.

### Implicació de cada cromosoma en les alteracions tipus intercanvi de la mostra final

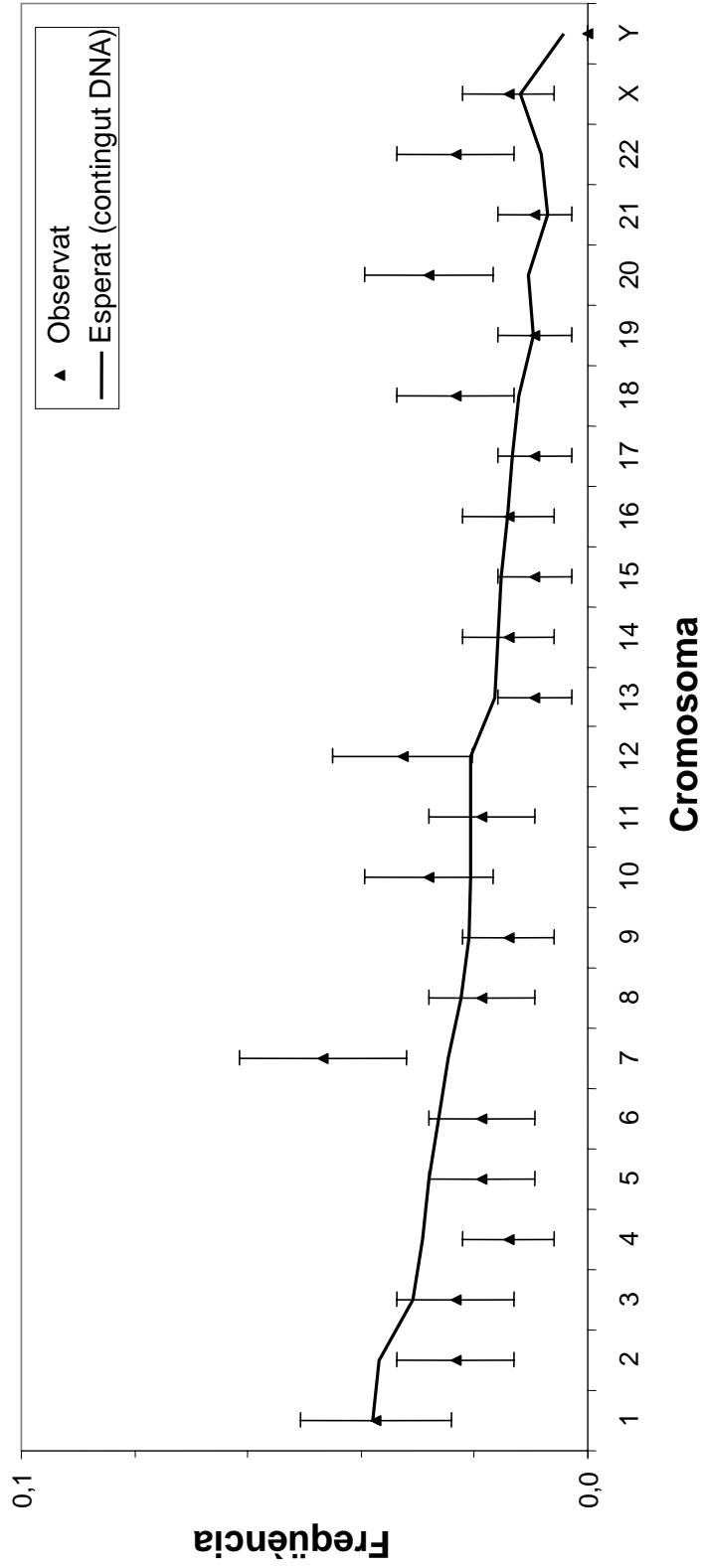


Figura 30. Frequència observada i esperada de la implicació de cada cromosoma en alteracions cromosòmiques tipus intercanvi en la mostra final (2 i 4 Gy). Les freqüències esperades han estat calculades tenint en compte el contingut de DNA (línia contínua) (Morton 1991). Les barres verticals indiquen els errors estàndards.

#### 5.2.3.4. Associacions cromosòmiques preferencials

L'mFISH permet veure quins cromosomes estan implicats en les alteracions tipus intercanvi, i per tant permet determinar si existeixen associacions preferencials entre cromosomes alhora de formar una alteració. Per aquest anàlisi s'ha utilitzat una aplicació web anomenada SCHIP (Statistics for CHromosome Interface Positioning) (Vives *et al.* 2005), que mitjançant simulacions de Montecarlo, valora si són significatives les desviacions respecte a la hipòtesi nul·la que considera que les associacions cromosoma-cromosoma es donen a l'atzar. Per tal de determinar si les dades de 2 i 4 Gy seguien una distribució normal, es va aplicar el test Kolmogorov-Smirnov que va mostrar que cap d'elles es distribuïa segons una normal. El test no paramètric de Wilcoxon va determinar que les dades de 2 i 4 Gy no eren diferents, el que va permetre combinar-les ( $p = 0,64$  i  $p = 0,38$  per a la mostra inicial i final respectivament). Per les mostres inicial i final, a les taules 18 i 19 s'hi pot veure el nombre d'intercanvis entre cromosomes i les desviacions respecte a la hipòtesi nul·la calculades mitjançant el test SCHIP. En la mostra inicial es detecten dotze associacions cromosòmiques preferencials amb una desviació respecte la hipòtesis nul·la major de 2 (taula 20). D'aquestes associacions n'hi ha deu (taula 20) que mostren un valor de  $p < 0,05$ . Degut a que les dades s'han obtingut fent múltiples tests, aquestes han hagut de ser corregides aplicant l'índex de falsos descobriments (FDR). Després d'aquesta correcció les associacions significatives van ser entre els cromosomes 13-20, 21-22, 15-17 i 11-20. A partir de les deu associacions entre dos cromosomes inicialment significatives, es va testar si hi havia associacions de més de dos cromosomes. Les associacions entre els cromosomes 1-4-5, 11-13-20 i 1-4-5-14, van mostrar-se estadísticament significatives. En la mostra final s'han trobat 16 associacions entre dos cromosomes amb una desviació major de 2,5 respecte la hipòtesi nul·la (taula 20). D'aquestes, 9 mostren una  $p < 0,05$ . Després de realitzar la correcció FDR, únicament les associacions entre els cromosomes 5-20 i 9-10 mantenen la significació. Pel que fa a les associacions de més de dos cromosomes, van mostrar significació respecte la hipòtesis nul·la les associacions entre els cromosomes 1-17-19, 2-4-6, 5-14-20 i 9-10-21.

Taula 18. Aparellaments cromosòmics de les alteracions radioinduides de la mostra inicial (extrem superior esquerra) i desviacions de l'estimació assumint un model a l'atzar mitjançant SCHIP (extrem inferior dreta). Anàlisi conjunt de les dades de 2 i 4 Gy.

| Crom. | 1  | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22    |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 22    | 1  | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  | 2  | 1  | 2  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 2  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 21    | 1  | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  |    | 3.27  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 20    | 0  | 2 | 0 | 4 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1  | 8  | 0  | 4  | 0  | 2  | 0  | 0  | 2  | 0  |    |    | 0.83  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 19    | 2  | 3 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 1  | 0  | 0  | 1  |    |    |    | -0.74 | -0.59 | -0.51 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 18    | 2  | 2 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1  | 1  | 0  | 1  | 1  | 1  | 0  | 1  |    |    |    |    | 0.94  | 1.57  | -0.66 | -0.57 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 17    | 3  | 2 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 1  | 1  | 0  | 2  | 1  | 6  | 2  |    |    |    |    |    | 0.33  | -0.76 | -0.99 | 0.50  | -0.68 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 16    | 0  | 1 | 4 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0  | 0  | 0  | 2  | 1  | 2  |    |    |    |    |    |    | 1.89  | -0.64 | -0.57 | -0.74 | 1.12  | -0.51 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 15    | 3  | 6 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1  | 2  | 2  | 2  | 2  |    |    |    |    |    |    |    | 1.41  | 3.98  | 0.04  | 0.27  | 0.60  | -0.90 | 0.48  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 14    | 8  | 3 | 1 | 3 | 0 | 0 | 2 | 1 | 3 | 1  | 0  | 5  | 2  |    |    |    |    |    |    |    |    | 0.13  | 0.27  | -0.31 | 0.04  | -0.87 | -1.14 | 0.21  | 1.75  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 13    | 5  | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 1 | 4  | 1  | 2  |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 0.26  | 0.26  | 1.55  | 0.68  | 0.13  | 0.36  | 2.56  | 0.30  | 0.58  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 12    | 1  | 0 | 6 | 4 | 0 | 3 | 0 | 6 | 1 | 3  | 5  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 0.11  | 2.09  | -0.02 | -1.23 | -1.04 | -0.92 | -1.21 | 0.10  | 1.58  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 11    | 1  | 6 | 1 | 1 | 3 | 3 | 1 | 2 | 3 | 0  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1.89  | -0.60 | -1.41 | 0.02  | -0.91 | -0.39 | -0.04 | -0.91 | 5.52  | -0.94 | 0.40  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 10    | 5  | 3 | 4 | 3 | 3 | 1 | 3 | 2 | 2 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | -1.52 | 0.40  | 1.47  | -0.78 | -0.95 | -0.47 | -0.12 | 1.16  | -0.43 | 2.09  | -0.85 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 9     | 4  | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 | 0 | 2 |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | -0.09 | 0.73  | -0.72 | -0.52 | 0.87  | -0.61 | -0.87 | 0.55  | 1.06  | 0.27  | -1.14 | -0.90 | -0.79 |       |       |       |       |       |       |       |
| 8     | 4  | 3 | 1 | 2 | 5 | 3 | 0 |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 0.13  | -0.09 | 0.02  | 2.79  | -0.52 | -0.61 | 0.27  | -0.31 | 0.04  | 0.27  | -1.14 | -0.90 | -0.79 |       |       |       |       |       |       |       |
| 7     | 2  | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | -0.76 | -0.76 | 2.85  | 0.48  | -0.80 | -0.72 | 1.89  | -0.76 | -0.49 | -0.65 | 1.27  | -0.49 | 0.92  | -0.51 | -0.44 |       |       |       |       |       |
| 6     | 4  | 3 | 3 | 3 | 2 |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 0.54  | 0.82  | 1.56  | -0.81 | 0.68  | 0.63  | 0.98  | -1.37 | -1.37 | 1.37  | -0.34 | 1.02  | -0.89 | -1.16 | -0.92 | -0.80 |       |       |       |       |
| 5     | 11 | 2 | 7 | 8 |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | -0.42 | 0.20  | 1.48  | -0.38 | -0.04 | 0.10  | -1.71 | -1.55 | -1.62 | -0.38 | -1.05 | -1.40 | -0.32 | -0.09 | 0.09  | -0.16 | 0.12  |       |       |       |
| 4     | 3  | 8 | 1 |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 2.46  | 0.34  | -0.87 | -0.26 | 0.11  | -0.99 | 0.81  | -1.48 | 0.39  | -0.90 | -1.00 | 0.15  | -1.13 | 0.99  | 1.73  | -0.07 | -0.90 |       |       |       |
| 3     | 6  | 4 |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | -1.27 | 1.79  | 0.26  | -0.89 | -0.95 | 0.94  | 0.62  | -1.04 | 1.92  | -1.51 | -0.95 | -0.95 | 2.87  | 0.09  | -1.15 | -0.05 | -1.34 | 1.78  | 0.16  |       |
| 2     | 10 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | -0.21 | 1.82  | -1.22 | -0.17 | -1.00 | -0.12 | -0.40 | 1.34  | -1.89 | -1.13 | -0.12 | 1.55  | -0.30 | -0.26 | 0.23  | 1.42  | -0.21 | -0.37 | -1.05 |       |
| 1     |    |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1.13  | 0.23  | -0.97 | 2.22  | -0.04 | 0.68  | 0.02  | 0.16  | -1.59 | -1.63 | 0.72  | 2.03  | -0.48 | -1.29 | 0.02  | -0.07 | 0.26  | -1.69 | -0.58 | -0.30 |

Crom.= Cromosoma.

Taula 19. Aparellaments cromosòmics de les alteracions radioinduides de la mostra final (extrem superior esquerra) i desviacions de l'estimació assumint un model a l'atzar mitjançant SCHIP (extrem inferior dreta). Anàlisi conjunt de les dades de 2 i 4 Gy.

| Crom. | 1    | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    | 20    | 21    | 22    |       |
|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 22    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 21    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 2     | 0     | 0     | 2     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | -0.28 |
| 20    | 0    | 0     | 2     | 2     | 4     | 0     | 2     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 2     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | -0.58 |
| 19    | 2    | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | -0.50 | -0.28 |
| 18    | 2    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 3     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | -0.35 | -0.71 | -0.40 | 2.55  |       |
| 17    | 2    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | -0.28 | -0.20 | -0.41 | -0.23 | -0.20 |       |
| 16    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 2     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | -0.23 | -0.40 | -0.28 | -0.58 | -0.32 | -0.28 |       |
| 15    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 2     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | -0.28 | -0.20 | -0.20 | -0.35 | -0.24 | -0.50 | -0.28 | -0.24 |       |
| 14    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | -0.28 | 2.76  | -0.23 | -0.40 | -0.28 | 2.88  | -0.32 | 3.29  |       |
| 13    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 2     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | -0.28 | -0.24 | -0.28 | -0.20 | -0.35 | -0.24 | -0.50 | -0.28 | -0.24 |       |
| 12    | 1    | 0     | 2     | 0     | 0     | 1     | 4     | 1     | 0     | 0     | 2     | 0     | -0.50 | -0.58 | 1.50  | -0.58 | -0.41 | -0.71 | -0.50 | -1.03 | -0.58 | -0.50 |       |
| 11    | 0    | 2     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 2.09  | -0.35 | -0.40 | -0.35 | 2.10  | -0.28 | -0.49 | -0.35 | -0.71 | -0.40 | -0.35 |       |
| 10    | 2    | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | -0.65 | -0.94 | 1.76  | -0.52 | -0.45 | -0.52 | -0.37 | -0.65 | -0.45 | -0.94 | 3.29  | -0.45 |       |
| 9     | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 6.21  | -0.45 | -0.65 | -0.31 | -0.36 | -0.31 | -0.36 | -0.26 | -0.45 | -0.31 | -0.65 | -0.36 | 2.87  |       |
| 8     | 2    | 0     | 0     | 0     | 2     | 0     | 0     | 0     | -0.49 | -0.70 | -0.53 | 0.52  | -0.37 | -0.43 | 4.97  | -0.43 | -0.30 | -0.53 | -0.37 | -0.77 | -0.43 | -0.37 |       |
| 7     | 0    | 2     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | -0.97 | -0.82 | -1.17 | -0.90 | 1.79  | 2.56  | -0.73 | -0.63 | 2.02  | -0.51 | 2.45  | -0.63 | 0.25  | 2.02  | -0.63 |       |
| 6     | 1    | 2     | 0     | 0     | 0     | 0     | -0.82 | -0.49 | -0.41 | 1.11  | -0.45 | 0.89  | -0.31 | -0.36 | -0.31 | -0.36 | -0.26 | -0.45 | -0.31 | -0.65 | -0.36 | -0.31 |       |
| 5     | 0    | 0     | 2     | 0     | 0     | -0.52 | -1.04 | 2.59  | -0.52 | -0.75 | -0.57 | -0.83 | -0.40 | -0.47 | -0.40 | -0.47 | -0.33 | -0.57 | -0.40 | 3.99  | -0.47 | -0.40 |       |
| 4     | 0    | 2     | 0     | 0     | -0.52 | -0.41 | 0.41  | -0.49 | -0.41 | -0.59 | -0.45 | -0.65 | -0.31 | -0.36 | -0.31 | -0.36 | -0.26 | -0.45 | -0.31 | 2.43  | -0.36 | -0.31 |       |
| 3     | 0    | 0     | 0     | -0.52 | 2.33  | -0.52 | -1.04 | -0.62 | -0.52 | -0.75 | 1.17  | 1.58  | -0.40 | -0.47 | -0.40 | -0.47 | -0.33 | -0.57 | 2.09  | 1.58  | -0.47 | -0.40 |       |
| 2     | 1    | 0     | -0.71 | 3.04  | -0.71 | 3.04  | 0.69  | -0.66 | -0.56 | -0.80 | 2.66  | -0.88 | -0.43 | -0.50 | -0.43 | -0.50 | -0.35 | -0.61 | -0.43 | -0.88 | -0.50 | -0.43 |       |
| 1     | 0.16 | -0.87 | -0.68 | -0.87 | 0.80  | -1.36 | 1.66  | -0.68 | 1.07  | -0.75 | -0.15 | -0.52 | -0.60 | -0.52 | -0.60 | -0.52 | 4.28  | 1.94  | 3.31  | -1.08 | -0.60 | -0.52 |       |

Crom.= Cromosoma

Taula 20. Associacions cromosòmiques i la seva significació.

| Mostra inicial             |         |                 | Mostra final               |         |                 |
|----------------------------|---------|-----------------|----------------------------|---------|-----------------|
| Associacions de cromosomes | SCHIP p | FDR P corregida | Associacions de cromosomes | SCHIP p | FDR p corregida |
| <i>Dos cromosomes</i>      |         |                 | <i>Dos cromosomes</i>      |         |                 |
| 10;21                      | 0,072   | 0,072           | 18;22                      | 0,114   | 0,114           |
| 12;14                      | 0,055   | 0,060           | 14;16                      | 0,099   | 0,105           |
| 1;14                       | 0,049   | 0,058           | 9;22                       | 0,096   | 0,109           |
| 13;20                      | 0,035   | 0,047           | 14;22                      | 0,076   | 0,094           |
| 21;22                      | 0,033   | 0,049           | 5;8                        | 0,061   | 0,081           |
| 7;10                       | 0,031   | 0,054           | 7;13                       | 0,059   | 0,085           |
| 1;5                        | 0,026   | 0,053           | 2;11                       | 0,058   | 0,092           |
| 4;5                        | 0,025   | 0,060           | 14;20                      | 0,041   | 0,073           |
| 3;16                       | 0,023   | 0,068           | 2;6                        | 0,041   | 0,081           |
| 8;12                       | 0,019   | 0,075           | 2;4                        | 0,037   | 0,084           |
| 15;17                      | 0,003   | 0,016           | 1;19                       | 0,033   | 0,087           |
| 11;20                      | 0,0002  | 0,002           | 10;21                      | 0,033   | 0,105           |
|                            |         |                 | 1;17                       | 0,014   | 0,056           |
|                            |         |                 | 8;15                       | 0,010   | 0,055           |
|                            |         |                 | 5;20                       | 0,005   | 0,042           |
|                            |         |                 | 9;10                       | 0,0003  | 0,005           |
| <i>Tres cromosomes</i>     |         |                 | <i>Tres cromosomes</i>     |         |                 |
| 1;4;5                      | 0,020   | 0,020           | 1;17;19                    | 0,041   | 0,041           |
| 11;13;20                   | 0,0003  | 0,001           | 2;4;6                      | 0,005   | 0,006           |
|                            |         |                 | 5;14;20                    | 0,003   | 0,005           |
|                            |         |                 | 9;10;21                    | 0,001   | 0,003           |
| <i>Quatre cromosomes</i>   |         |                 |                            |         |                 |
| 1;4;5;14                   | 0,040   | 0,040           |                            |         |                 |

FDR (False Discovery Rate) = Índex de falsos descobriments.

## 6. DISCUSSIÓ





## 6.1. Irradiacions parcials

### 6.1.1. Resultats citogenètics

En el present estudi la proporció d'intercanvis incomplets en relació al total d'intercanvis, va estar majoritàriament entre el 20 i el 30%, tant per dicèntrics com per translocacions, i no es va observar dependència de la dosi. Els percentatges d'anomalies incompletes descrits en altres estudis en limfòcits humans exposats a radiacions de baixa LET, van des d'un 10% a un 40% quan no s'utilitzen sondes pantelomèriques, (Natarajan *et al.* 1992, Tucker and Senft 1994, Finnon *et al.* 1995, Durante *et al.* 1996, Knehr *et al.* 1996, Simpson and Savage 1996, Barquinero *et al.* 1998, Boei *et al.* 1998, Barquinero *et al.* 1999, Fomina *et al.* 2000). Quan s'utilitzen sondes pantelomèriques, el percentatge de intercanvis incomplets baixa a un 5% (Boei and Natarajan 1998, Boei *et al.* 1998, Wu *et al.* 1998, Boei *et al.* 2000, Deng and Lucas 1999, Fomina *et al.* 2000). Aquests resultats refermen la idea que la majoria dels intercanvis incomplets són en realitat complets però no es poden detectar com a complets amb tècniques de pintat cromosòmic, degut probablement a que els segments intercanviats tenen una mida massa petita per a poder ser detectats. S'ha descrit que el límit de detecció per les parts pintades i no pintades és 11.1 i 14.6 Mb respectivament (Kodama *et al.* 1997). El fet que la proporció d'intercanvis incomplets no depengui de la dosi i que el seu nombre sigui constant, podria indicar que la seva inclusió en els estudis de dosimetria biològica tant per a l'elaboració de les corbes dosi-efecte com per a l'anàlisi de un cas concret no variarà la dosi estimada. De fet, quan en el present estudi es comparen les dosis estimades utilitzant només anomalies completes i les obtingudes amb el total d'anomalies (completes i incompletes), no s'observen diferències significatives.

El percentatge d'anomalies complexes respecte al total d'anomalies augmenta amb la dosi. Aquest resultat, concorda amb els obtinguts en una corba dosi-efecte elaborada utilitzant la mateixa font de raigs X i la mateixa combinació de sondes cromosòmiques (Barquinero *et al.* 1999). L'increment de cèl·lules amb aberracions complexes a mida que augmenta la dosi, també

ha estat descrit per altres autors (Finnon *et al.* 1995, Lindholm *et al.* 1998) que treballen amb altres tipus d'irradiació o altres combinacions de sondes cromosòmiques. Per altra banda, també s'ha descrit que la proporció relativa d'anomalies complexes varia en funció de la LET (Knehr *et al.* 1999). El fet que la freqüència de les alteracions complexes variï en funció de la dosi i de la LET de la radiació, fa que aquestes es puguin utilitzar en l'estimació de la dosi sempre que s'hagin tingut en compte en l'elaboració de la corba dosi efecte. Cal tenir en compte que en l'anàlisi amb pintat de tres cromosomes, alteracions que és consideren simples són en realitat part d'alteracions complexes, que degut a limitacions de la tècnica no és poden discriminar (Simpson and Savage 1996).

#### 6.1.2. Utilitat de les tècniques de FISH en la detecció d'irradiacions parcials i en la determinació de la dosi.

Per a determinar la dosi d'una exposició a radiacions ionitzants cal tenir en compte les característiques de l'exposició. El primer que cal saber és si l'exposició ha afectat la totalitat de l'organisme o només una part. En dosimetria biològica per distingir entre exposicions parcials i totals s'analitza la distribució de cèl·lules que contenen dicèntrics o translocacions. Quan aquesta distribució segueix una distribució de Poisson es considera que estem davant d'una exposició homogènia, i quan no la segueix, l'exposició es considera com a no homogènia i per tant pot ser parcial. En estudis amb tinció uniforme, on s'analitza la distribució de dicèntrics, o dicèntrics més anells, s'ha descrit que el test u és una eina molt útil per avaluar irradiacions parcials (Lloyd *et al.* 1973, Lloyd *et al.* 1987, Lloyd *et al.* 1991, Barquinero *et al.* 1997, Senthamizhchelvan *et al.* 2007). Un estudi previ del nostre laboratori (Barquinero *et al.* 1997), dut a terme mitjançant l'anàlisi de dicèntrics tenyits uniformement, va mostrar que per percentatges de sang irradiada del 75% o inferiors, el test u sempre detectava sobredispersió, indicant que la fracció irradiada sense alteracions cromosòmiques estava contaminada per sang no irradiada, es a dir, que la exposició a radiacions ionitzants havia estat parcial.

Pel que fa a la utilització de tècniques de FISH per l'anàlisi d'exposicions parcials, s'ha descrit que amb un 90% de sang irradiada "*in vitro*" a 4 Gy de raigs X (Guerrero-Carbajal *et al.* 1998), i fent cultius de 48, 72 i 96h, per totes les alteracions analitzades es va detectar sobredispersió en metafases de primeres divisions mitòtiques, excepte per les translocacions en el cultiu de 72h. El present estudi ha pretès determinar si les tècniques de FISH són útils per a detectar irradiacions parcials, en un ventall ampli de dosis i de parcialitat, analitzant un total de 4 dosis i 5 dilucions per a cadascuna. Per tal de determinar les desviacions de la distribució de Poisson, s'han utilitzat 2 tests diferents, la *u* (Rao and Chakravarti 1956) i l'*s* (Bohning *et al.* 1998). Tot i que ambdós tests han mostrat la mateixa capacitat de detecció d'irradiacions parcials, cal assenyalar que el test *s* és més específic per aquesta finalitat doncs es focalitza en detectar si el primer terme de la distribució de Poisson (cèl·lules sense aberracions) està contaminat per cèl·lules no irradiades. Utilitzant el pintat cromosòmic la capacitat de detecció de la sobredispersió es veu disminuïda en relació als estudis previs de dicèntrics amb tinció uniforme (Barquinero *et al.* 1997). Això, és degut a que mitjançant FISH, la fracció del genoma pintada utilitzant sondes pels cromosomes 1, 4 i 11 és de 0,1922 (Morton 1991), el que implica que només es puguin detectar un 31,8% del total d'intercanvis (Lucas *et al.* 1992) i per tant que la freqüència d'aberracions sigui de menor magnitud, i sobretot que sigui més difícil observar cèl·lules amb dos o més alteracions. En el nostre estudi amb tècniques de pintat cromosòmic s'observa que per percentatges de sang exposada a radiacions ionitzants superiors al 75%, pot ser difícil distingir una irradiació parcial d'una irradiació total. Aquest resultat contrasta amb l'anàlisi realitzat amb dicèntrics i tinció uniforme, on es detectava que una exposició era parcial fins i tot amb un 87,5% de sang irradiada. També contrasta amb resultats previs obtinguts per Guerrero Carbajal (Guerrero-Carbajal *et al.* 1998) on va ser possible detectar sobredispersió en una irradiació parcial del 90% a 4 Gy.

Pel que fa a les estimacions de la dosi, tot i les minses diferències observades entre els diferents tipus d'anomalies cromosòmiques considerades, les alteracions aparentment simples són les que presenten una major proximitat

entre la dosi estimada i la real. En general, considerant les dosis com a parcials, i utilitzant el mètode descrit per Dolphin, les dosis estimades van ser més ajustades a les reals que les dosis estimades considerant les irradiacions com a totals, la qual cosa indica que la dosi d'una exposició parcial també pot ser estimada aplicant les tècniques de pintat cromosòmic. Això, malgrat algunes excepcions (per exemple les AST al 75% de sang irradiada a 5 Gy), en general es compleix tant per les alteracions tipus translocació com per les de tipus dicèntric. De totes formes, per fer biodosimetria en casos d'exposicions recents, els resultats obtinguts amb l'anàlisi de dicèntrics en metafases tenyides uniformement, s'ajusten millor a les dosis reals d'irradiació (Barquinero *et al.* 1999). Per altra banda, s'ha descrit que en casos d'irradiacions parcials la pèrdua preferent de cèl·lules amb dicèntrics influeix sobre la freqüència de translocacions, cosa que no succeeix quan la irradiació és total (Guerrero-Carbajal *et al.* 1998). Això és degut a que en una irradiació total, les distribucions de dicèntrics i translocacions són independents i cadascuna segueix una Poisson. En canvi, quan la irradiació és parcial, les translocacions i dicèntrics estan confinats a la part irradiada, i per tant, les distribucions de dicèntrics i translocacions en el total de les cèl·lules no són independents, de manera que l'eliminació de cèl·lules amb dicèntrics afecta la freqüència de translocacions. A dosis elevades quan només es tenen en compte les cèl·lules sense alteracions inestables la detecció de la sobredispersió, usant els tests  $u$  i  $s$ , i la precisió en l'estimació de la dosi es veu reduïda si es compara amb els resultats obtinguts considerant totes les cèl·lules. Per exemple, en les mostres irradiades a 5 Gy, cap de les dilucions va mostrar sobredispersió, i en quatre de elles, la dosi no es va poder estimar. Això és degut a que no hi havia cèl·lules sense alteracions inestables amb dos o més translocacions.

El present estudi, indica que tenint en compte les limitacions de la tècnica de pintat cromosòmic posades de manifest, aquesta es pot aplicar per realitzar biodosimetria parcial.

## 6.2. Persistència de les alteracions cromosòmiques a llarg termini

### 6.2.1. Persistència de les alteracions cromosòmiques amb pintat cromosòmic

De l'ampli ventall d'alteracions cromosòmiques que s'indueixen després d'una exposició a radiacions ionitzants, els dicèntrics i les translocacions són les majoritàries. Dicèntrics i translocacions s'indueixen a una freqüència similar, però així com els dicèntrics no superen amb èxit les successives divisions cel·lulars, les translocacions si que les superen en gran part.

En estudis realitzats amb models animals s'ha descrit que la freqüència de les translocacions disminueix amb el temps post-exposició a mida que augmenta la dosi d'irradiació (Hande and Natarajan 1998, Spruill *et al.* 1996, Tucker *et al.* 1997, Xiao *et al.* 1999). Pel que fa a exposicions totals accidentals en humans s'ha observat que la freqüència de translocacions persisteix a dosis per sota dels 1 a 3 Gy (Lindholm and Salomaa 2000, Sevan'kaev *et al.* 2005) però que disminueix a dosis altes i prolongades (Lindholm *et al.* 2002). En pacients tractats amb radioteràpia es veu que com més gran és la freqüència inicial de translocacions més gran és la seva posterior disminució (Huber *et al.* 1999, Tawn and Whitehouse 2003, Xuncla *et al.* 2008). En general doncs, la freqüència de les translocacions no es manté estable després d'una irradiació a dosis altes. Per tant a l'hora d'estimar una dosi d'exposició de forma retrospectiva, com més alta sigui la dosi inicial més difícil serà estimar adequadament la dosi inicial.

#### *Factors que influeixen en la persistència de les translocacions*

L'anàlisi de mFISH permet distingir entre translocacions completes, incompletes i "one-way". En el present estudi, en el cultiu irradiat a 2 Gy, la freqüència de translocacions completes i "one-way" es manté relativament constant al llarg del temps, mentre que en el cultiu irradiat a 4 Gy la freqüència de translocacions es redueix al final del cultiu a una tercera part de la mostra inicial. En canvi, les translocacions verdaderament incompletes desapareixen en l'última mostra tant als cultius irradiats a 2 com a 4 Gy.

Diferents estudis realitzats amb FISH on es distingien translocacions completes de incompletes, esmenten que les translocacions completes són les que persisteixen més en el temps (Hande and Natarajan 1998, Lindholm *et al.* 1998, Xiao *et al.* 1999, Littlefield *et al.* 2000, Pressl *et al.* 2000, Pala *et al.* 2001, Gardner and Tucker 2002, Lindholm *et al.* 2002), malgrat que en aquests estudis les translocacions incompletes inclouen les translocacions incompletes verdaderes i les “one-way”. De tota manera, al cultiu irradiat a 4 Gy, no sembla que la reducció de la freqüència de translocacions simples es degui únicament a la pèrdua de les translocacions incompletes verdaderes, perquè la suma de la freqüència de translocacions completes i “one-way” també disminueix. Quan només es consideren les cèl·lules estables, la freqüència de les alteracions transmissibles no varien de la primera a l’última mostra, de totes formes el nombre de cèl·lules estables en la mostra inicial és massa petit i per poder assegurar amb contundència que aquesta sigui la raó.

Es sap que translocacions i dicèntrics s’indueixen a freqüències similars després d’una irradiació, i que les cèl·lules que contenen només un dicentric complet tenen una probabilitat del 42% de donar cèl·lules filles (Bauchinger *et al.* 1986, Braselmann *et al.* 1986, Vazquez *et al.* 2002). Després d’irradiar limfòcits a 3 Gy amb raigs X limfòcits la majoria de cèl·lules apoptòtiques contenen dicèntrics (Belloni *et al.* 2008).

En el present estudi, a 2 Gy la freqüència inicial de dicèntrics hauria de ser la mateixa que la observada per a les translocacions (0,33). Passades 48h de la irradiació, que corresponen a 1,3 duplicacions cel·lulars, i considerant la teòrica transmissió dels dicèntrics explicada anteriorment, s’esperaria una freqüència de dicèntrics del 0,12, lleugerament inferior a la observada de 0,19. A 4 Gy i fent servir la mateixa aproximació, la freqüència de dicèntrics 48h després de la irradiació (0,5 duplicacions cel·lulars) s’esperaria que fos 0,38 i va ser de 0,41. La major similitud entre les freqüències de dicèntrics i translocacions a 4 Gy que a 2 Gy, es podria explicar pel menor número de duplicacions de la població cel·lular després de la irradiació a 4 Gy.

### 6.2.2. Estudi amb mFISH

Si comparem les freqüències observades amb mFISH amb les del pintat cromosòmic amb tres cromosomes, s'observa bona correlació malgrat que la freqüència de les alteracions complexes observades amb mFISH va ser major que amb pintat cromosòmic. Les tècniques multicolors són més eficaces per detectar les alteracions complexes (Lucas and Sachs 1993, Braselmann *et al.* 2005), indicant que algunes alteracions complexes no es detecten o classifiquen erròniament com a simples quan s'usen tècniques de FISH de un sol color. Pel que fa al grau de complexitat de les alteracions observades, en les mostres inicials l'estructura de cicle de major grau es va observar a 4 Gy. Això concorda amb altres estudis, on la freqüència d'alteracions complexes és directament proporcional a la dosi i al nombre de trencament involucrats (Loucas and Cornforth 2001). D'altra banda, s'ha proposat que les insercions podrien ser uns bons biomarcadors per a detectar exposicions retrospectives a radiacions d'alta LET (Anderson *et al.* 2000). Les insercions són les alteracions complexes més freqüentment detectades en individus exposats ocupacionalment a plutoni, de totes formes també s'observen altres alteracions complexes tant transmissibles com no transmissibles (Anderson *et al.* 2005). En el nostre estudi, realitzat amb radiacions de baixa LET, també es poden detectar insercions temps després d'irradiar a dosis altes. La disminució de la complexitat amb el temps post-irradiació, concorda amb la descrita després d'exposicions a partícules  $\alpha$  (Anderson *et al.* 2003). Que la freqüència d'alteracions complexes estables al final del cultius sigui tant baixa concorda amb la poca eficiència de les radiacions de baixa LET per induir alteracions cromosòmiques complexes estables (Anderson *et al.* 2003, Hande *et al.* 2005).

Respecte la disminució al llarg del temps de les translocacions completes i "one-way" a 4 Gy, no pot ser causada únicament a la presència de les alteracions complexes ja que a 2 Gy les alteracions complexes desapareixen al llarg de temps mentre que les translocacions completes i les "one-way" es mantenen. Els nostres resultats indiquen que la dosi influeix en la disminució de les translocacions amb el temps post-irradiació, i aquesta disminució no

pot ser explicada únicament per la desaparició de les translocacions incompletes i les alteracions complexes. Usant FISH painting i simulacions de Monte Carlo, s'ha vist que les freqüències de les translocacions poden disminuir com a conseqüència d'una selecció negativa de cèl·lules que contenen dicèntrics i per inherent letalitat de d'algunes translocacions, s'ha descrit que les translocacions "one-way" són més letals que les translocacions completes (Gardner and Tucker 2002). Les translocacions classificades com a "one-way" usant painting es classifiquen com a translocacions "one-way" o translocacions incompletes verdaderes quan s'usa mFISH. Els nostres resultats reflecteixen que les translocacions incompletes verdaderes podrien ser letals en la seva majoria. La selecció negativa que pateixen les alteracions inestables a cada duplicació també la poden patir les alteracions estables incompletes.

### 6.2.3. Sensibilitat cromosòmica

Quan es considera la participació de cada un dels cromosomes en les alteracions radioinduides, estudis realitzats amb pintat cromosòmic evidencien que en general no hi ha cromosomes amb una sensibilitat especial, malgrat algunes excepcions puntuals (Barquinero *et al.* 1998, Cigarran *et al.* 1998, Braselmann *et al.* 2003). Per les alteracions cromosòmiques tipus intercanvi analitzades mitjançant el pintat cromosòmic, s'ha suggerit que el model que millor s'ajusta a la participació de cada cromosoma és el que té en compte l'àrea de la superfície dels territoris de cada cromosoma ( $\text{DNA}^{2/3}$ ) enlloc de considerar únicament el contingut de DNA (Cigarran *et al.* 1998). La tècnica d'mFISH permet estudiar simultàniament la participació de cada cromosoma en les alteracions radioinduides. Amb l'mFISH, la participació de cada cromosoma en les alteracions tipus intercanvi mostra un millor ajust amb el model de l'àrea de la superfície que amb el model que considera únicament el contingut de DNA (Cornforth *et al.* 2002b, Durante *et al.* 2002). En canvi, quan es considera el total de les alteracions cromosòmiques, és a dir, incloent aquelles que no són de tipus intercanvi, el model que millor s'ajusta és el del contingut de DNA (Anderson *et al.* 2006). En el nostre estudi, en relació a les alteracions tipus intercanvi no s'han observat



desviacions respecte a la participació a l'atzar de cada cromosoma ni quan es considera el model de contingut de DNA ni considerant el de l'àrea de superfície. En canvi, quan es considera el nombre de trencaments en totes les alteracions cromosòmiques, ambdós models mostren una desviació significativa respecte a la participació a l'atzar de cada cromosoma, malgrat que el model que considera el contingut de DNA és el que presenta un millor ajust. Les diferències descrites es podrien deure en part al gran nombre d'alteracions tipus no intercanvi detectades en el present estudi. Aquesta freqüència és clarament superior a la detectada en limfòcits (Loucas and Cornforth 2001). Aquestes diferències es podrien deure als diferents tipus cel·lulars emprats.

Quan es valoren els efectes de les radiacions ionitzants a llarg termini, no es pot descartar que hi hagi selecció d'alguna alteració. En aquest sentit, el cromosoma 7 mostra un comportament curiós, ja que està menys involucrat de l'esperat en les alteracions en la mostra inicial, mentre que està més involucrat de l'esperat en la mostra final. S'ha relacionat la deleció parcial del cromosoma 7 amb leucèmies agudes i mielodisplàsiques humanes en pacients amb història d'exposicions genotòxiques (Pedersen and Ellegaard 1994), incloent radioteràpia (Philip and Pedersen-Bjergaard 1988). Alteracions clonals on el cromosoma 7 està involucrat s'han observat en gran percentatge de mielodisplàsies relacionades amb teràpies (t-MDS) i en leucèmies mieloides agudes (t-AML) (Smith *et al.* 2003). En supervivents de la bomba atòmica, aproximadament el 50% de les t-AML tenien anomalies en els cromosomes 5 i 7, en contrast amb el 15% observat en AML de pacients sense història d'exposició prèvia a radiacions ionitzants. Això indica que els supervivents de la bomba atòmica afectats per AML mostren més similituds amb leucèmies relacionades amb teràpies que amb AML/MDS *de novo* (Plumb 2003). Cal destacar que la línia cel·lular Jurkat que s'ha utilitzat en el present estudi és una línia cel·lular derivada d'una leucèmia limfoblàstica humana de cèl·lules T. En aquesta leucèmia, més d'un 50% dels casos presenta un cariotip normal i en els casos amb anomalies citogenètiques les més freqüents són translocacions on està involucrat el gen TCRB que es localitza en braç q del cromosoma 7 (Graux *et al.* 2006).

Malgrat que s'ha suggerit que els cromosomes ocupen de forma preferent una posició relativa en el nucli cel·lular (Khalil *et al.* 2007), aquesta posició no és fixa i no és manté en totes les cèl·lules d'una població (Cornforth *et al.* 2002a, Parada and Misteli 2002, Parada *et al.* 2002). Aquesta variabilitat en la organització dels cromosomes en el nucli interfàsic podria ser específica de cada teixit, suggerint que cada tipus cel·lular podria tenir uns requeriments específics per la posició dels cromosomes en el nucli interfàsic (Boyle *et al.* 2001, Parada *et al.* 2004) i per l'activitat global dels seus gens (Bridger *et al.* 2000). A més, s'ha suggerit que els territoris cromosòmics interfàsics presenten zones de contacte on es barregen entre ells, el grau de barreja dels territoris cromosòmics en limfòcits humans s'ha correlacionat amb la freqüència de translocacions cromosòmiques, el que implica que els DSB formats dins de les zones de contacte són més propensos a participar en els reordenaments intercromosòmics (Branco and Pombo 2006). De les associacions de cromosomes estadísticament significatives observades en el nostre estudi, la translocació entre els cromosomes 15 i 17 ha estat relacionada amb leucèmies mieloide agudes relacionades amb el tractament (Fenaux *et al.* 1989, Shali *et al.* 2006). En aquests cromosomes es localitzen els gens PML i RAR, els quals estan associats en el nucli interfàsic dels precursors hematopoètics, indicant una proximitat física entre els cromosomes 15 i 17 (Neves *et al.* 1999). El clúster dels cromosomes 1-17-19 coincideix amb el clúster 1-16-17-19-22 descrit en alteracions cromosòmiques radiogèniques (Boyle *et al.* 2001, Arsuaga *et al.* 2004). En aplicar el test de Wilcoxon per a dades aparellades, i combinant les nostres dades amb les d'Arsuaga (Arsuaga *et al.* 2004) es va observar que no hi havia diferències significatives entre les dades ( $p=0,83$ ). Un cop combinades les dades, i després d'aplicar la correcció FDR, es van detectar 5 "clusters" de cromosomes que mostraven significació estadística: 13-14 ( $p=0,002$ ), 16-20, 6-12, 11-12 i 6-19 aquests últims amb valors de  $p$  entre 0,043 a 0,049. Entre les translocacions Robertsonianes humanes, les més comunes són entre els cromosomes 13 i 14 (Engels *et al.* 2008).

## 7. CONCLUSIONS



1. Amb el pintat de tres cromosomes, s'ha detectat sobredispersió de la distribució de Poisson a dosis altes d'irradiació i a percentatges baixos de sang irradiada. Al comparar aquests resultats amb els obtinguts amb tinció uniforme es pot concloure que la tècnica de FISH no és tant acurada com la tinció uniforme per detectar exposicions parcials.
2. Per les anomalies considerades, les dosis estimades considerant la irradiació com a parcial són més properes a la dosi real que les estimades considerant la irradiació com a total. En l'estimació de la dosi de la fracció irradiada, les translocacions (AST) i els dicèntrics (ASD) aparentment simples són les alteracions cromosòmiques que permeten una millor aproximació a la dosi real. En casos d'exposicions parcials recents, les tècniques de FISH mostren uns intervals de confiança menys ajustats que la tinció uniforme.
3. Les freqüències de les alteracions tipus no intercanvi, dicèntrics i alteracions complexes disminueixen de forma dràstica amb les successives divisions cel·lulars.
4. Les translocacions, són les alteracions cromosòmiques radioinduídes que mostren una freqüència més estable amb el temps post-irradiació. Tot i així, s'ha detectat un efecte important de la dosi en l'estabilitat de la freqüència de les translocacions amb el temps post-irradiació. A 2 Gy, la freqüència de translocacions no varia amb el temps post-irradiació, però a 4 Gy disminueix de forma significativa.
5. La tècnica d'mFISH permet diferenciar entre alteracions simples i complexes. De les alteracions simples, l'mFISH permet diferenciar entre completes, incompletes i "one-way". En el cas de les alteracions complexes l'mFISH permet determinar el grau de complexitat.
6. Dels diferents tipus de translocacions simples detectades, les completes i les "one-way" són les que mostren una major estabilitat, mentre que les simples incompletes desapareixen al llarg del temps post-irradiació.

7. Les alteracions complexes mostren una estructura de cicle més elevada, és a dir major complexitat, en el cultiu irradiat a 4 Gy que en l'irradiat a 2 Gy. A ambdues dosi, la freqüència d'alteracions complexes disminueix amb els temps post-irradiació. Això és degut a que hi ha molt poques alteracions complexes que no incloguin cromosomes dicèntrics, acèntrics o en anell.
8. En relació a la implicació dels cromosomes per formar alteracions radioinduides tipus intercanvi, no s'han detectat desviacions significatives respecte a la hipòtesi de la participació a l'atzar. No obstant, quan es considera el total d'alteracions cromosòmiques radioinduides si s'han detectat desviacions.
9. El cromosoma 7 està menys involucrat de l'esperat en les alteracions cromosòmiques en la mostra inicial després de la irradiació, mentre que està més involucrat de l'esperat en la mostra final.
10. Quan s'analitza la formació d'alteracions cromosòmiques radioinduides, s'han detectat 7 associacions cromosòmiques preferencials en la mostra inicial i 6 en la final. No hi ha associacions cromosòmiques preferencials comunes entre la mostra inicial i la final, encara que algunes de les detectades són recurrents en estudis d'alteracions cromosòmiques radioinduides en limfòcits, i probablement indiquen distribucions determinades dels cromosomes en el nucli interfàsic d'aquest tipus cel·lular.

## 8. BIBLIOGRAFIA





**A**nderson, R.M., Marsden, S.J., Paice, S.J., Bristow, A.E., Kadhim, M.A., Griffin, C.S. and Goodhead, D.T. (2003) Transmissible and nontransmissible complex chromosome aberrations characterized by three-color and mFISH define a biomarker of exposure to high-LET alpha particles. *Radiat. Res.*, 159, 40-48.

Anderson, R.M., Marsden, S.J., Wright, E.G., Kadhim, M.A., Goodhead, D.T. and Griffin, C.S. (2000) Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.*, 76, 31-42.

Anderson, R.M., Sumption, N.D., Papworth, D.G. and Goodhead, D.T. (2006) Chromosome breakpoint distribution of damage induced in peripheral blood lymphocytes by densely ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 82, 49-58.

Anderson, R.M., Tsepenco, V.V., Gasteva, G.N., Molokanov, A.A., Sevan'kaev, A.V. and Goodhead, D.T. (2005) mFISH analysis reveals complexity of chromosome aberrations in individuals occupationally exposed to internal plutonium: a pilot study to assess the relevance of complex aberrations as biomarkers of exposure to high-LET alpha particles. *Radiat. Res.*, 163, 26-35.

Arsuaga, J., Greulich-Bode, K.M., Vazquez, M., Bruckner, M., Hahnfeldt, P., Brenner, D.J., Sachs, R. and Hlatky, L. (2004) Chromosome spatial clustering inferred from radiogenic aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.*, 80, 507-515.

Awa, A.A., Sofuni, T., Honda, T., Itoh, M., Neriishi, S. and Otake, M. (1978) Relationship between the radiation dose and chromosome aberrations in atomic bomb survivors of Hiroshima and Nagasaki. *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, 19, 126-140.

**B**arquintero, J.F., Barrios, L., Caballin, M.R., Miro, R., Ribas, M. and Egozcue, J. (1997) Biological dosimetry in simulated in vitro partial irradiations. *Int. J. Radiat. Biol.*, 71, 435-440.

Barquintero, J.F., Cigarran, S., Caballin, M.R., Braselmann, H., Ribas, M., Egozcue, J. and Barrios, L. (1999) Comparison of X-ray dose-response curves obtained by chromosome painting using conventional and PAINT nomenclatures. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75, 1557-1566.

Barquintero, J.F., Knehr, S., Braselmann, H., Figel, M. and Bauchinger, M. (1998) DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization painting of all chromosomes of a human female karyotype. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74, 315-323.

Bauchinger, M., Schmid, E. and Braselmann, H. (1986) Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. II. Experimental findings in human lymphocytes analysed in first and second post-irradiation metaphases. *Radiat. Environ. Biophys.*, 25, 253-260.

Bauchinger, M., Schmid, E., Braselmann, H., Willich, N. and Clemm, C. (1989) Time-effect relationship of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes after radiation therapy for seminoma. *Mutat. Res.*, 211, 265-272.

Belloni, P., Meschini, R., Lewinska, D. and Palitti, F. (2008) Apoptosis preferentially eliminates irradiated g0 human lymphocytes bearing dicentric chromosomes. *Radiat. Res.*, 169, 181-187.

Boei, J.J. and Natarajan, A.T. (1998) Combined use of chromosome painting and telomere detection to analyse radiation-induced chromosomal aberrations in mouse splenocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 73, 125-133.

Boei, J.J., Vermeulen, S., Fomina, J. and Natarajan, A.T. (1998) Detection of incomplete exchanges and interstitial fragments in X-irradiated human lymphocytes using a telomeric PNA probe. *Int. J. Radiat. Biol.*, 73, 599-603.

Boei, J.J., Vermeulen, S. and Natarajan, A.T. (2000) Analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using telomeric and centromeric PNA probes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 76, 163-167.

Bohning, D., Dietz, E. and Schlattmann, P. (1998) Recent developments in computer-assisted analysis of mixtures. *Biometrics*, 54, 525-536.

Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J.M., Mahy, N.L., Ellis, J.A. and Bickmore, W.A. (2001) The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 211-219.

Branco, M.R. and Pombo, A. (2006) Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol.*, 4, e138.

Brasemann, H., Bauchinger, M. and Schmid, E. (1986) Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. I. Derivation of formulae for the determination of transmission and survival parameters of aberrations. *Radiat. Environ. Biophys.*, 25, 243-251.

Brasemann, H., Kulka, U., Baumgartner, A., Eder, C., Muller, I., Figel, M. and Zitzelsberger, H. (2005) SKY and FISH analysis of radiation-induced chromosome aberrations: a comparison of whole and partial genome analysis. *Mutat. Res.*, 578, 124-133.

Brasemann, H., Kulka, U., Huber, R., Figel, H.M. and Zitzelsberger, H. (2003) Distribution of radiation-induced exchange aberrations in all human chromosomes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 79, 393-403.

Bridger, J.M., Boyle, S., Kill, I.R. and Bickmore, W.A. (2000) Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Curr. Biol.*, 10, 149-152.

Buckton, K.E., Hamilton, G.E., Paton, L. and Langlois, A.O. (1978) *Chromosome aberrations in irradiated ankylosing spondylitis patients*.

**C**amparoto, M.L., Ramalho, A.T., Natarajan, A.T., Curado, M.P. and Sakamoto-Hojo, E.T. (2003) Translocation analysis by the FISH-painting method for retrospective dose reconstruction in individuals exposed to ionizing radiation 10 years after exposure. *Mutat. Res.*, 530, 1-7.

Chadwick, K.H. and Leenhouts, H.P. (1981) *Molecular theory of radiation biology*. Springer-Verlag, New York, NY, United States.

Chadwick, K.H. and Leenhouts, H.P. (1978) The rejoining of DNA double-strand breaks and a model for the formation of chromosomal rearrangements. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, 33, 517-529.

Cigarran, S., Barrios, L., Barquinero, J.F., Caballin, M.R., Ribas, M. and Egozcue, J. (1998) Relationship between the DNA content of human chromosomes and their involvement in radiation-induced structural aberrations, analysed by painting. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74, 449-455.

Cornforth, M.N. (2001) Analyzing radiation-induced complex chromosome rearrangements by combinatorial painting. *Radiat. Res.*, 155, 643-659.

Cornforth, M.N., Bailey, S.M. and Goodwin, E.H. (2002a) Dose responses for chromosome aberrations produced in noncycling primary human fibroblasts by alpha particles, and by gamma rays delivered at sublimiting low dose rates. *Radiat. Res.*, 158, 43-53.

Cornforth, M.N., Greulich-Bode, K.M., Loucas, B.D., Arsuaga, J., Vazquez, M., Sachs, R.K., Bruckner, M., Molls, M., Hahnfeldt, P., Hlatky, L., et al (2002b) Chromosomes are predominantly located randomly with respect to each other in interphase human cells. *J. Cell Biol.*, 159, 237-244.

**D**eng, W. and Lucas, J.N. (1999) Combined FISH with pan-telomeric PNA and whole chromosome-specific DNA probes to detect complete and incomplete chromosomal exchanges in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75, 1107-1112.

Dolphin, G.W. (1969) Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. *Handling of radiation accidents STI/PUB/229.*, 215-224.

Durante, M., George, K., Wu, H. and Cucinotta, F.A. (2002) Karyotypes of human lymphocytes exposed to high-energy iron ions. *Radiat. Res.*, 158, 581-590.

Durante, M., George, K., Wu, H. and Yang, T.C. (1996) Rejoining and misrejoining of radiation-induced chromatin breaks. I. experiments with human lymphocytes. *Radiat. Res.*, 145, 274-280.

**E**dwards, A.A. (2000) Editorial - Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH). *Radiat Prot Dosimetry*, 88, 5-6.

Edwards, A.A., Lindholm, C., Darroudi, F., Stephan, G., Romm, H., Barquinero, J., Barrios, L., Caballin, M.R., Roy, L., Whitehouse, C.A., et al (2005) Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 113, 396-402.

Edwards, A.A., Lloyd, D.C. and Purrott, R.J. (1979) Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution. *Radiat. Environ. Biophys.*, 16, 89-100.

Engels, H., Eggermann, T., Caliebe, A., Jelska, A., Schubert, R., Schuler, H.M., Panasiuk, B., Zaremba, J., Latos-Bielenska, A., Jakubowski, L., et al (2008) Genetic counseling in Robertsonian translocations der(13;14): frequencies of reproductive outcomes and infertility in 101 pedigrees. *Am. J. Med. Genet. A.*, 146A, 2611-2616.

**F**enaux, P., Lucidarme, D., Lai, J.L. and Bauters, F. (1989) Favorable cytogenetic abnormalities in secondary leukemia. *Cancer*, 63, 2505-2508.

Finnon, P., Lloyd, D.C. and Edwards, A.A. (1995) Fluorescence in situ hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.*, 68, 429-435.

Fomina, J., Darroudi, F., Boei, J.J. and Natarajan, A.T. (2000) Discrimination between complete and incomplete chromosome exchanges in X-irradiated human lymphocytes using FISH with pan-centromeric and chromosome specific DNA probes in combination with telomeric PNA probe. *Int. J. Radiat. Biol.*, **76**, 807-813.

**G**ardner, S.N. and Tucker, J.D. (2002) The cellular lethality of radiation-induced chromosome translocations in human lymphocytes. *Radiat. Res.*, **157**, 539-552.

Graux, C., Cools, J., Michaux, L., Vandenberghe, P. and Hagemeijer, A. (2006) Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia*, **20**, 1496-1510.

Gregoire, E., Sorokine-Durm, I., Bertho, J.M., Jacquet, N., Delbos, M., Demarquay, C., Voisin, P. and Roy, L. (2006) Follow-up of stable chromosomal aberrations in gamma-ray irradiated non-human primates. *Int. J. Radiat. Biol.*, **82**, 493-502.

Guerrero-Carbajal, Y.C., Moquet, J.E., Edwards, A.A. and Lloyd, D.C. (1998) The Persistence of FISH Translocations for Retrospective Biological Dosimetry after Simulated Whole or Partial Body Irradiation. *Radiat Prot Dosimetry*, **76**, 159-168.

Gulston, M., de Lara, C., Jenner, T., Davis, E. and O'Neill, P. (2004) Processing of clustered DNA damage generates additional double-strand breaks in mammalian cells post-irradiation. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1602-1609.

**H**all, E.J. and Giaccia, A.J. (eds) (2006) *Radiobiology for the radiologist*. Sixth Edition edn, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Hande, M.P., Azizova, T.V., Burak, L.E., Khokhryakov, V.F., Geard, C.R. and Brenner, D.J. (2005) Complex chromosome aberrations persist in individuals many years after occupational exposure to densely ionizing radiation: an mFISH study. *Genes Chromosomes Cancer*, **44**, 1-9.

Hande, M.P., Boei, J.J., Granath, F. and Natarajan, A.T. (1996) Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X-irradiation analysed by fluorescence in situ hybridization. I. Dicentrics and translocations. *Int. J. Radiat. Biol.*, **69**, 437-446.

Hande, M.P. and Natarajan, A.T. (1998) Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X-irradiation analysed by fluorescence in situ hybridization. IV. Dose response. *Int. J. Radiat. Biol.*, **74**, 441-448.

Huber, R., Braselmann, H., Kulka, U., Schumacher-Georgiadou, V., Bayerl, A., Molls, M. and Bauchinger, M. (1999) Follow-up analysis of translocation and dicentric frequencies, measured by FISH-chromosome painting in breast cancer patients after partial-body radiotherapy with little bone marrow exposure. *Mutat. Res.*, **446**, 103-109.

**I**AEA (2001) *Cytogenetic analysis for radiation dose assessment*. International Atomic Energy Agency. Technical Report Series. Vienna.

ICRP 92 (2004) *Relative biological effectiveness (RBE), quality factor (Q), and radiation weighting factor (WR)*, International Commission on Radiological Protection. *Annals of the ICRP*. Pergamon Press, Oxford.

ISCN (2009) *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Karger, Basel, Switzerland.

**K**halil, A., Grant, J.L., Caddle, L.B., Atzema, E., Mills, K.D. and Arneodo, A. (2007) Chromosome territories have a highly nonspherical morphology and nonrandom positioning. *Chromosome Res.*, 15, 899-916.

Knehr, S., Huber, R., Braselmann, H., Schraube, H. and Bauchinger, M. (1999) Multicolour FISH painting for the analysis of chromosomal aberrations induced by 220 kV X-rays and fission neutrons. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75, 407-418.

Knehr, S., Zitzelsberger, H. and Bauchinger, M. (1998) FISH-based analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using different nomenclature systems. *Int. J. Radiat. Biol.*, 73, 135-141.

Knehr, S., Zitzelsberger, H., Braselmann, H., Nahrstedt, U. and Bauchinger, M. (1996) Chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization: further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.*, 70, 385-392.

Kodama, Y., Nakano, M., Ohtaki, K., Delongchamp, R., Awa, A.A. and Nakamura, N. (1997) Estimation of minimal size of translocated chromosome segments detectable by fluorescence in situ hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.*, 71, 35-39.

**L**ea, D.E. and Catcheside, D.G. (1942) The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in *Tradescantia*. *Journal of Genetics*, 44, 216-245.

Lindholm, C., Luomahaara, S., Koivistoinen, A., Ilus, T., Edwards, A.A. and Salomaa, S. (1998) Comparison of dose-response curves for chromosomal aberrations established by chromosome painting and conventional analysis. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74, 27-34.

Lindholm, C., Romm, H., Stephan, G., Schmid, E., Moquet, J. and Edwards, A. (2002) Intercomparison of translocation and dicentric frequencies between laboratories in a follow-up of the radiological accident in Estonia. *Int. J. Radiat. Biol.*, 78, 883-890.

Lindholm, C. and Salomaa, S. (2000) Dose Assessment of Past Accidental or Chronic Exposure Using FISH Chromosome Painting. *Radiat Prot Dosimetry*, 88, 21-25.

Lindholm, C., Tekkel, M., Veidebaum, T., Ilus, T. and Salomaa, S. (1998) Persistence of translocations after accidental exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74, 565-571.

Littlefield, L.G., McFee, A.F., Sayer, A.M., O'Neill, J.P., Kleinerman, R.A. and Maor, M.H. (2000) Induction and Persistence of Chromosome Aberrations in Human Lymphocytes Exposed to Neutrons In vitro or In vivo: Implications of Findings in 'Retrospective' Biological Dosimetry. *Radiat Prot Dosimetry*, 88, 59-68.

Lloyd, D.C., Edwards, A.A., Natarajan, A.T. and Darroudi, F. (1991) Biological dosimetry applied to in vitro simulated partial body irradiation. In *Treatment and Biological Dosimetry of Exposed Persons: Post-Chernobyl Action*. EUR 12558. Commission of the European Communities, Luxembourg, 51-80.

Lloyd, D.C., Edwards, A.A., Prosser, J.S., Barjaktarovic, N., Brown, J.K., Horvat, D., Ismail, S.R., Koteles, G.J., Almasy, Z. and Krepinsky, A. (1987) A collaborative exercise on cytogenetic dosimetry for simulated whole and partial body accidental irradiation. *Mutat. Res.*, 179, 197-208.

Lloyd, D.C., Moquet, J.E., Oram, S., Edwards, A.A. and Lucas, J.N. (1998) Accidental intake of tritiated water: a cytogenetic follow-up case on translocation stability and dose reconstruction. *Int. J. Radiat. Biol.*, 73, 543-547.

Lloyd, D.C. and Purrott, R.J. (1981) Chromosome Aberration Analysis in Radiological Protection Dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry*, 1, 19-28.

Lloyd, D.C., Purrott, R.J. and Dolphin, G.W. (1973) Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation. *Phys. Med. Biol.*, 18, 421-431.

Lobrich, M. and Jeggo, P.A. (2007) The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat. Rev. Cancer.*, 7, 861-869.

Loucas, B.D. and Cornforth, M.N. (2001) Complex chromosome exchanges induced by gamma rays in human lymphocytes: an mFISH study. *Radiat. Res.*, 155, 660-671.

Lucas, J.N., Awa, A., Straume, T., Poggensee, M., Kodama, Y., Nakano, M., Ohtaki, K., Weier, H.U., Pinkel, D. and Gray, J. (1992) Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 62, 53-63.

Lucas, J.N., Hill, F.S., Burk, C.E., Cox, A.B. and Straume, T. (1996) Stability of the translocation frequency following whole-body irradiation measured in rhesus monkeys. *Int. J. Radiat. Biol.*, 70, 309-318.

Lucas, J.N., Poggensee, M. and Straume, T. (1992) The persistence of chromosome translocations in a radiation worker accidentally exposed to tritium. *Cytogenet. Cell Genet.*, 60, 255-256.

Lucas, J.N. and Sachs, R.K. (1993) Using three-color chromosome painting to test chromosome aberration models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 1484-1487.

**M**atsumoto, K., Ramsey, M.J., Nelson, D.O. and Tucker, J.D. (1998) Persistence of radiation-induced translocations in human peripheral blood determined by chromosome painting. *Radiat. Res.*, 149, 602-613.

Merrill, G.F. (1998) Cell synchronization. In *Methods in Cell Biology*. In Mather, J. P. and Barnes, D. (eds) *Animal Cell Culture Methods* Academic Press, San Diego, 229-249.

Morton, N.E. (1991) Parameters of the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88, 7474-7476.

**N**atarajan, A.T. (1984) Origin and significance of chromosomal alterations. *Mutations in man*, 156-176.

Natarajan, A.T., Vyas, R.C., Darroudi, F. and Vermeulen, S. (1992) Frequencies of X-ray-induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by in situ hybridization using chromosome-specific DNA libraries. *Int. J. Radiat. Biol.*, 61, 199-203.

Neves, H., Ramos, C., da Silva, M.G., Parreira, A. and Parreira, L. (1999) The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood*, 93, 1197-1207.

**P**ala, F.S., Moquet, J.E., Edwards, A.A. and Lloyd, D.C. (2001) In vitro transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 474, 139-146.

Parada, L. and Misteli, T. (2002) Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol.*, 12, 425-432.

Parada, L.A., McQueen, P.G. and Misteli, T. (2004) Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol.*, 5, R44.

Parada, L.A., McQueen, P.G., Munson, P.J. and Misteli, T. (2002) Conservation of relative chromosome positioning in normal and cancer cells. *Curr. Biol.*, 12, 1692-1697.

Pedersen, B. and Ellegaard, J. (1994) A factor encoded by 7q31 suppresses expansion of the 7q- clone and delays cytogenetic progression. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 78, 181-188.

Philip, P. and Pedersen-Bjergaard, J. (1988) Cytogenetic, clinical, and cytologic characteristics of radiotherapy-related leukemias. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 31, 227-236.

Plumb, M. (2003) Comments on the paper: Microsatellite instability in acute myelocytic leukaemia developed from A-bomb survivors--a biological perspective. *Int. J. Radiat. Biol.*, 79, 367-70; author reply 371-4.

Pressl, S., Romm, H., Ganguly, B.B. and Stephan, G. (2000) Experience with FISH-detected Translocations as an Indicator in Retrospective Dose Reconstructions. *Radiation Protection Dosimetry*, 88, 45-49.

**R**ao, C.R. and Chakravarti, I.M. (1956) Some Small Sample Tests of Significance for a Poisson Distribution. *Biometrics*, 12, 264-264-282.

Revell, S.H. (1959) The accurate estimation of chromatid breakage, and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiations. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 150, 563-589.

Rodriguez, P., Montoro, A., Barquinero, J.F., Caballin, M.R., Villaescusa, I. and Barrios, L. (2004) Analysis of translocations in stable cells and their implications in retrospective biological dosimetry. *Radiat. Res.*, 162, 31-38.

**S**alassidis, K., Georgiadou-Schumacher, V., Braselmann, H., Muller, P., Peter, R.U. and Bauchinger, M. (1995) Chromosome painting in highly irradiated Chernobyl victims: a follow-up study to evaluate the stability of symmetrical translocations and the influence of clonal aberrations for retrospective dose estimation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 68, 257-262.

## Bibliografia

- Sasaki, M.S. and Miyata, H. (1968) Biological dosimetry in atomic bomb survivors. *Nature*, 220, 1189-1193.
- Savage, J.R. (1998) A brief survey of aberration origin theories. *Mutat. Res.*, 404, 139-147.
- Savage, J.R. and Simpson, P.J. (1994) FISH "painting" patterns resulting from complex exchanges. *Mutat. Res.*, 312, 51-60.
- Savage, J.R.K. (1970) Sites of radiation induced chromosome exchanges. *Journal Name: Curr. Top. Radiat. Res. 6: 129-94(1970).; Other Information: Orig. Receipt Date: 31-DEC-72, Medium: X.*
- Sax, K. (1940) An Analysis of X-Ray Induced Chromosomal Aberrations in *Tradescantia*. *Genetics*, 25, 41-68.
- Senthamizhchelvan, S., Pant, G.S., Rath, G.K., Julka, P.K., Nair, O., Joshi, R.C., Malhotra, A. and Pandey, R.M. (2007) Biodosimetry using chromosome aberrations in human lymphocytes. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 123, 241-245.
- Sevan'kaev, A.V., Lloyd, D.C., Edwards, A.A., Khvostunov, I.K., Mikhailova, G.F., Golub, E.V., Shepel, N.N., Nadejina, N.M., Galstian, I.A., Nugis, V.Y., et al (2005) A cytogenetic follow-up of some highly irradiated victims of the Chernobyl accident. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 113, 152-161.
- Shali, W., Helias, C., Fohrer, C., Struski, S., Gervais, C., Falkenrodt, A., Leymarie, V., Lioure, B., Raby, P., Herbrecht, R., et al (2006) Cytogenetic studies of a series of 43 consecutive secondary myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukemias: conventional cytogenetics, FISH, and multiplex FISH. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 168, 133-145.
- Simpson, P.J. and Savage, J.R. (1996) Dose-response curves for simple and complex chromosome aberrations induced by X-rays and detected using fluorescence in situ hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.*, 69, 429-436.
- Smith, S.M., Le Beau, M.M., Huo, D., Karrison, T., Sobecks, R.M., Anastasi, J., Vardiman, J.W., Rowley, J.D. and Larson, R.A. (2003) Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*, 102, 43-52.
- Spruill, M.D., Ramsey, M.J., Swiger, R.R., Nath, J. and Tucker, J.D. (1996) The persistence of aberrations in mice induced by gamma radiation as measured by chromosome painting. *Mutat. Res.*, 356, 135-145.
- Stephan, G. and Pressl, S. (1997) Chromosome aberrations in human lymphocytes analysed by fluorescence in situ hybridization after in vitro irradiation, and in radiation workers, 11 years after an accidental radiation exposure. *Int. J. Radiat. Biol.*, 71, 293-299.
- T**awn, E.J. and Whitehouse, C.A. (2003) Persistence of translocation frequencies in blood lymphocytes following radiotherapy: implications for retrospective radiation biodosimetry. *J. Radiol. Prot.*, 23, 423-430.
- Tucker, J.D. (1995) Protocol for aberration identification and nomenclature terminology. *Mutagenesis*, 10, 267.
- Tucker, J.D., Breneman, J.W., Briner, J.F., Eveleth, G.G., Langlois, R.G. and Moore, D.H., 2nd (1997) Persistence of radiation-induced translocations in rat peripheral blood determined by chromosome painting. *Environ. Mol. Mutagen.*, 30, 264-272.



Tucker, J.D. and Senft, J.R. (1994) Analysis of naturally occurring and radiation-induced breakpoint locations in human chromosomes 1, 2 and 4. *Radiat. Res.*, 140, 31-36.

**V**azquez, M., Greulich-Bode, K.M., Arsuaga, J., Cornforth, M.N., Bruckner, M., Sachs, R.K., Hlatky, L., Molls, M. and Hahnfeldt, P. (2002) Computer analysis of mFISH chromosome aberration data uncovers an excess of very complicated metaphases. *Int. J. Radiat. Biol.*, 78, 1103-1115.

Vives, S., Loucas, B., Vazquez, M., Brenner, D.J., Sachs, R.K., Hlatky, L., Cornforth, M. and Arsuaga, J. (2005) SCHIP: statistics for chromosome interphase positioning based on interchange data. *Bioinformatics*, 21, 3181-3182.

**W**u, H., George, K. and Yang, T.C. (1998) Estimate of true incomplete exchanges using fluorescence in situ hybridization with telomere probes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 73, 521-527.

**X**iao, Y., Darroudi, F., Grigorova, M. and Natarajan, A.T. (1999) Induction and persistence of chromosomal exchanges in mouse bone marrow cells following whole-body exposure to X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75, 1119-1128.

Xuncla, M., Barquinero, J.F., Caballin, M.R., Craven-Bartle, J., Ribas, M., de Vega, J.M. and Barrios, L. (2008) Cytogenetic damage induced by radiotherapy. Evaluation of protection by amifostine and analysis of chromosome aberrations persistence. *Int. J. Radiat. Biol.*, 84, 243-251.

**Z**aider, M. and Rossi, H.H. (eds) (2001) *Radiation science for physicians and public health workers*. Kluwer Academic/Plenum, New York.



## 9. ANNEXES



## Suitability of FISH Painting Techniques for the Detection of Partial-Body Irradiations for Biological Dosimetry

A. Duran,<sup>a</sup> J. F. Barquinero,<sup>a,1</sup> M. R. Caballín,<sup>a</sup> M. Ribas,<sup>b</sup> P. Puig,<sup>c</sup> J. Egozcue<sup>d</sup> and L. Barrios<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Unitat d'Antropologia, Dpt. Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia; <sup>b</sup> Servei de Radiofísica i Radioprotecció de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; <sup>c</sup> Servei d'Estadística; and <sup>d</sup> Unitat de Biologia Cel·lular, Dpt. Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

Duran, A., Barquinero, J. F., Caballín, M. R., Ribas, M., Puig, P., Egozcue, J. and Barrios, L. Suitability of FISH Painting Techniques for the Detection of Partial-Body Irradiations for Biological Dosimetry. *Radiat. Res.* 157, 461–468 (2002).

Peripheral blood was irradiated with 2, 3, 4 or 5 Gy of X rays and was mixed with nonirradiated blood at five different dilutions to simulate partial-body irradiations. Analysis by FISH was performed using whole-chromosome painting probes for chromosomes 1, 4 and 11 in combination with a pancentromeric probe. Chromosome aberrations affecting the painted fraction were classified according to the PAINT nomenclature; other unstable aberrations affecting the unpainted material were also recorded. To evaluate the suitability of painting for dose assessment in partial-body irradiations, the ability of the *u* test and a proposed *s* test to detect the expected overdispersion and the similarity between the real doses and the doses estimated using Dolphin's approach were considered. For short-term biodosimetry, compared with solid-stained dicentric analyses, the suitability of FISH painting techniques for the detection of partial-body exposures is reduced, because of the decrease in the frequency of aberrations detected by FISH and in the number of cells with two or more aberrations. For reconstruction of past doses, when only complete apparently simple translocations in cells free of unstable aberrations were considered, the detection of the overdispersion and the accuracy of dose estimations were dramatically reduced. In a partial-body exposure, as the original dose increased, the whole-body dose estimated a long time after irradiation would tend to be lower, and the difference from the original dose would tend to be greater. © 2002 by Radiation Research Society

### INTRODUCTION

The analysis of dicentric chromosomes using fluorescence plus Giemsa (FPG) staining to limit scoring to solid-stained first-division cells is considered the best method for short-term biological dosimetry (1). Deriving a dose from

a measured yield of dicentrics by using a dose–response curve provides a reliable estimate of the average whole-body absorbed dose.

In cases in which it is known whether an overexposure affected the whole body or only part of it, one way to discriminate is to check if the distribution of chromosome aberrations among cells follows a Poisson distribution. For partial-body exposures, two methods have been described for estimating the dose received in the part of the body that was irradiated. Both methods are based on the consideration of aberrations observed in damaged cells. The method proposed by Dolphin (2), termed the contaminated Poisson method, assumes that two Poisson distributions exist in the observed distribution of dicentrics, one from the exposed cells and another from the unexposed cells. Considering the low frequency of dicentrics in unexposed cells, these cells contaminate the first term of the Poisson distribution ( $e^{-\lambda}$ ), a contamination that can be detected as an overdispersion. By this method, estimates of the fraction of cells analyzed that had been irradiated and the fraction of cells originally exposed can be obtained, but the method requires the observation of a sufficient number of cells carrying two or more dicentrics. The second method, termed  $Q_{dr}$  (3), considers the yield of dicentrics and rings only in those cells that contain unstable aberrations.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques, particularly chromosome painting, which evaluate the yield of translocations, have become important tools for use in retrospective quantitative analyses (4–9). It has been shown that the coefficients of the dose–response curves for the induction of translocations or dicentrics obtained by FISH techniques are quite similar to those for the induction of dicentrics obtained by solid-stained analyses (5, 6, 10–12). This indicates that for short-term biodosimetry, the use of FISH or solid-stained techniques should give similar dose estimations. However, when painting techniques are used, only part of the genome is analyzed, and the only aberrations observed are those in which at least one of the chromosomes involved is highlighted by the probes. As a result, decreases in the frequencies of aberrations and of cells with two or more aberrations are observed. This can compromise the detection of partial-body exposures by FISH in short-

<sup>1</sup> Author to whom correspondence should be addressed at Unitat d'Antropologia, Dpt. Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain; e-mail: Francesc.Barquinero@uab.es.

**TABLE 1**  
**Cytogenetic Results Obtained for each Dose and Dilution by Painting Chromosomes 1, 4 and 11**

|                                         | Dose (Gy)    |      | 2    |      |      |      |      | 3    |      |      |    |      |
|-----------------------------------------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|------|
|                                         | Dilution (%) |      | 87.5 | 75   | 50   | 25   | 12.5 | 87.5 | 75   | 50   | 25 | 12.5 |
| Cells scored                            | 974          | 1551 | 1322 | 1516 | 1322 | 849  | 824  | 1009 | 1070 | 1096 |    |      |
| Cells with aberrations                  | 159          | 183  | 126  | 74   | 41   | 232  | 165  | 152  | 57   | 59   |    |      |
| Simple aberrations                      |              |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |      |
| t(Ba) t(Ab)                             | 51           | 62   | 46   | 22   | 10   | 76   | 53   | 63   | 17   | 24   |    |      |
| t(Ba) ace (b)                           | 2            | 3    | 0    | 2    | 0    | 2    | 0    | 1    | 2    | 0    |    |      |
| t(Ab)                                   | 10           | 7    | 0    | 1    | 4    | 6    | 6    | 6    | 4    | 6    |    |      |
| t(Ba)                                   | 6            | 5    | 13   | 6    | 2    | 22   | 11   | 6    | 3    | 2    |    |      |
| Percentage of incompletes               | 26.1         | 19.5 | 22.0 | 29.0 | 37.5 | 28.3 | 24.3 | 17.1 | 34.6 | 25.0 |    |      |
| Apparently simple translocations        | 69           | 77   | 59   | 31   | 16   | 106  | 70   | 76   | 26   | 32   |    |      |
| dic(BA) ace(ab)                         | 41           | 63   | 44   | 30   | 8    | 91   | 57   | 50   | 22   | 19   |    |      |
| dic(BA) ace(b)                          | 2            | 5    | 3    | 1    | 1    | 12   | 2    | 9    | 0    | 2    |    |      |
| ace(ab)                                 | 2            | 2    | 1    | 1    | 0    | 1    | 5    | 3    | 2    | 1    |    |      |
| dic(BA)                                 | 20           | 15   | 7    | 3    | 5    | 24   | 15   | 9    | 6    | 3    |    |      |
| Percentage of incompletes               | 36.9         | 25.9 | 20.0 | 14.3 | 42.9 | 28.9 | 27.8 | 29.6 | 26.7 | 24.0 |    |      |
| Apparently simple dicentrics            | 65           | 85   | 55   | 35   | 14   | 128  | 79   | 71   | 30   | 25   |    |      |
| r(B) ace (b)                            | 4            | 7    | 3    | 1    | 0    | 6    | 12   | 6    | 2    | 3    |    |      |
| r(b)                                    | 0            | 2    | 0    | 0    | 0    | 2    | 1    | 0    | 1    | 0    |    |      |
| Other                                   | 2            | 3    | 0    | 0    | 0    | 0    | 3    | 0    | 1    | 2    |    |      |
| Complex aberrations                     |              |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |      |
| t(Ba) ace (ab)                          | 4            | 3    | 2    | 2    | 3    | 12   | 5    | 3    | 1    | 5    |    |      |
| dic(BA) t(Ab)                           | 3            | 4    | 0    | 0    | 0    | 5    | 2    | 6    | 1    | 1    |    |      |
| Other                                   | 4            | 5    | 2    | 3    | 2    | 7    | 9    | 13   | 1    | 2    |    |      |
| Percentage of complex                   | 7.3          | 6.5  | 3.3  | 6.9  | 14.3 | 9.0  | 8.8  | 12.6 | 4.8  | 11.4 |    |      |
| Aberrations between painted chromosomes | 6            | 7    | 6    | 3    | 4    | 7    | 6    | 9    | 3    | 2    |    |      |
| Terminal deletions                      | 11           | 18   | 10   | 3    | 6    | 16   | 7    | 8    | 9    | 1    |    |      |

term studies. For reconstruction of past doses after a uniform exposure, when the distributions of translocations and dicentrics follow a Poisson distribution, the yield of translocations should not decrease with time due to the elimination of cells with dicentrics. This should not be the case after a past partial-body exposure because of the mixture of irradiated and unirradiated cells (13).

The aim of the present study was to evaluate the suitability of FISH painting techniques for dose assessment in cases of partial-body irradiations by mixing irradiated and nonirradiated blood to simulate 20 partial-body irradiations. To compare the results with those of solid-stained dicentric analyses for short-term biodosimetry, the aberrations involving both painted and unpainted chromosomes were considered, in all cells analyzed. For reconstruction of past doses, only total apparently simple translocations observed in cells free of unstable aberrations were considered, including unstable aberrations in unpainted material.

## MATERIALS AND METHODS

To ensure the ethics of the research, all governmental and institutional guidelines were followed. The Commission of Ethics on Humans and Animal Experimentation (CEEAH) of the Universitat Autònoma de Bar-

celona approved the present project on July 2, 1998. The donor of blood samples gave his informed consent before the beginning of the project.

### Irradiation and Culture Conditions

Peripheral blood samples from a healthy 32-year-old male with no history of exposure to clastogenic agents, including radiation, were obtained by venipuncture and collected into heparinized tubes. The samples were irradiated with 2, 3, 4 and 5 Gy using an X-ray source with a beam quality corresponding to a half-value layer of 1.43 mm copper (180 kV, 9 mA and 0.5 mm copper filtration). The dose rate was 0.27 Gy/min. The recommendations of the IAEA (1) were followed for the irradiations.

To simulate partial-body exposures, irradiated and unirradiated blood was mixed when the cultures were set up to obtain the following proportions of irradiated blood: 87.5%, 75%, 50%, 25% and 12.5%. In all cases, 0.8 ml of mixed blood was cultured for 48 h in 5 ml of RPMI 1640 medium supplemented with 20% fetal calf serum, antibiotics, phytohemagglutinin and 12 µg/ml of bromodeoxyuridine. Colcemid was added 2 h before harvesting. The frequency of second-division metaphases, determined by the FPG technique on parallel slides, was less than 5%.

### Fluorescence In Situ Hybridization

Hybridization with Cy3-labeled probes for chromosomes 1, 4 and 11 (Cambio, UK) and a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled pancromic probe (Cambio) was carried out as described previously (14). Counterstaining was performed with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) with a concentration of 1 µg/ml antifade solution (Cambio).

**TABLE 1**  
**Continued**

| 4    |      |      |      |      | 3    |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 87.5 | 75   | 50   | 25   | 12.5 | 87.5 | 75   | 50   | 25   | 12.5 |
| 463  | 504  | 775  | 1035 | 1040 | 374  | 553  | 523  | 890  | 1260 |
| 168  | 128  | 119  | 66   | 37   | 175  | 164  | 87   | 78   | 42   |
| 54   | 57   | 56   | 20   | 23   | 52   | 53   | 40   | 27   | 12   |
| 3    | 1    | 2    | 0    | 0    | 8    | 6    | 2    | 0    | 0    |
| 7    | 9    | 4    | 4    | 1    | 5    | 4    | 6    | 4    | 3    |
| 8    | 5    | 4    | 5    | 0    | 10   | 10   | 1    | 5    | 1    |
| 25.0 | 20.8 | 15.2 | 31.0 | 4.2  | 30.7 | 27.4 | 11.1 | 25.0 | 25.0 |
| 72   | 72   | 66   | 29   | 24   | 75   | 73   | 49   | 36   | 16   |
| 72   | 57   | 50   | 28   | 12   | 71   | 78   | 30   | 36   | 18   |
| 6    | 2    | 0    | 1    | 2    | 9    | 2    | 6    | 3    | 0    |
| 4    | 2    | 5    | 1    | 0    | 4    | 5    | 1    | 0    | 0    |
| 12   | 7    | 4    | 8    | 2    | 18   | 13   | 4    | 5    | 5    |
| 23.4 | 16.2 | 15.3 | 26.3 | 25.0 | 30.4 | 20.4 | 26.8 | 18.2 | 21.7 |
| 94   | 68   | 59   | 38   | 16   | 102  | 98   | 41   | 44   | 23   |
| 4    | 5    | 6    | 3    | 1    | 8    | 9    | 6    | 5    | 3    |
| 0    | 0    | 4    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    |
| 0    | 0    | 1    | 3    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    |
| 6    | 2    | 3    | 3    | 0    | 8    | 7    | 2    | 3    | 5    |
| 10   | 9    | 12   | 1    | 0    | 20   | 8    | 12   | 5    | 1    |
| 7    | 14   | 10   | 5    | 1    | 14   | 15   | 6    | 9    | 2    |
| 11.9 | 14.7 | 15.5 | 11   | 2.4  | 18.5 | 14.2 | 17.2 | 16.7 | 16.0 |
| 8    | 5    | 5    | 3    | 2    | 12   | 11   | 3    | 7    | 1    |
| 8    | 2    | 0    | 3    | 0    | 13   | 7    | 3    | 4    | 2    |

### Scoring Criteria

Metaphases were examined using a triple-band pass filter, and the painted chromosomes were analyzed using Cy3, FITC and DAPI filters.

Each abnormal metaphase was analyzed as a unit using the PAINT nomenclature (15) as proposed by Knehr *et al.* (16) to consider the underlying mechanisms of the formation of aberrations. After the painted material was analyzed, using the DAPI and FITC filters, the presence of any unstable aberration (dicentric, acentric or ring) in the full chromosome set was also recorded.

### Statistical Analysis

For the different chromosome abnormalities considered, and to check whether their distribution among cells followed a Poisson distribution, the *u* test was used (17). This test is a normalized unit of the dispersion index  $D = s^2/y$  (variance/mean), which for a Poisson distribution should be unity; it is widely used in biological dosimetry studies (18, 19). *u* values higher than 1.96 indicate an overdispersion (significance level,  $\alpha = 0.025$ ). The *u* test is a general test to detect departures from Poisson distribution against overdispersed alternatives. It seems more realistic to use a specific test to contrast Poisson-distributed data with a zero-contaminated Poisson distribution. In this sense, the *s* test (20) can be applied. The *s* values can be calculated easily using the formula:  $s = \{N^{1/2} \times [(n_0/N) \times e^y - 1]/(e^y - y - 1)^{1/2}\}$ , where *N* is the number of cells scored, *n*<sub>0</sub> is the number of cells free of aberrations, and *y* is the observed frequency of aberrations. With this test, an overdispersion occurs when *s* values are higher than 1.96 (significance level,  $\alpha = 0.025$ ). As indicated in the Results and the Discussion, the *u* and *s* tests showed a similar

ability to detect the overdispersion. The main practical advantage in the *s* test is that information on the distribution of aberrations among cells is not needed, in contrast to the calculation of variance in the *u* test.

To estimate the frequency of aberrations in the irradiated fraction ( $\lambda$ ) and the dose received, the zero-contaminated Poisson method (1, 2) was used. First, the frequency was estimated by solving the equation  $(\lambda/1 - e^{-\lambda}) = (X/N - n_0)$ , because  $\lambda$  is the maximum likelihood estimator of that frequency. In this equation,  $\lambda$  is the mean yield of the aberration considered in the irradiated fraction, and  $e^{-\lambda}$  represents the fraction of undamaged cells among the cells in the irradiated population. The solution  $\lambda$  can be obtained by iteration, but due to the low magnitude of  $\lambda$ , a good approximation of  $\lambda$  can also be obtained by solving the equation  $\lambda = \{12 [X/(N - n_0)] - 3\}^{-1/2} - 3$ . In fact, this solution is exact up to 2 decimal places when  $[X/(N - n_0)] < 1.7$ . To calculate the 95% confidence intervals of the dose estimations, the term  $X/(N - n_0)$ , the truncated Poisson yield, and its variance  $\text{var} [X/(N - n_0)] = X/[1 + \lambda - X/(N - n_0)]/(N - n_0)^2$  were used.

Dose estimates for the different types of chromosomal abnormalities were calculated from the dose-effect curves published previously for each aberration type (12). In this case, and because the same cocktail of probes was used in both studies, we did not use genomic frequencies, but instead used direct ones. The coefficients of the curves for each abnormality are indicated in Table 3 and the figure legends.

## RESULTS

Table 1 shows the cytogenetic results obtained for each dose and dilution using the PAINT nomenclature. A total

**TABLE 2**  
**Frequencies of Total Translocations and Dicentrics per 100 Cells  $\pm$  SE, and  $u$  and  $s$  Values**

| Dose (Gy) | Percentage of irradiated blood | Total translocations               |             |                 | Total dicentrics                   |             |             |
|-----------|--------------------------------|------------------------------------|-------------|-----------------|------------------------------------|-------------|-------------|
|           |                                | $y \pm$ SE                         | $u$         | $s$             | $y \pm$ SE                         | $u$         | $s$         |
| 2         | 100                            | <i>11.13 <math>\pm</math> 1.42</i> | -0.68       | -0.71           | <i>11.70 <math>\pm</math> 1.45</i> | -0.83       | -0.86       |
|           | 87.5                           | 8.01 $\pm$ 0.91                    | -0.05       | -0.03           | 7.19 $\pm$ 0.84                    | -0.94       | -0.97       |
|           | 75                             | 5.54 $\pm$ 0.60                    | -0.23       | -0.23           | 6.00 $\pm$ 0.64                    | 1.95        | <b>2.06</b> |
|           | 50                             | 4.69 $\pm$ 0.61                    | 1.31        | 1.35            | 4.24 $\pm$ 0.58                    | 1.70        | 1.74        |
|           | 25                             | 2.37 $\pm$ 0.41                    | <b>2.46</b> | <b>2.46</b>     | 2.44 $\pm$ 0.43                    | <b>3.86</b> | <b>3.88</b> |
| 3         | 100                            | <i>26.18 <math>\pm</math> 2.61</i> | 0.65        | 0.80            | <i>20.20 <math>\pm</math> 2.30</i> | 0.68        | 0.56        |
|           | 87.5                           | 14.96 $\pm$ 1.36                   | 1.17        | 0.72            | 16.14 $\pm$ 1.39                   | 0.31        | 0.52        |
|           | 75                             | 9.95 $\pm$ 1.13                    | 0.98        | 1.10            | 10.44 $\pm$ 1.16                   | 1.22        | 1.37        |
|           | 50                             | 9.81 $\pm$ 1.08                    | <b>4.65</b> | <b>4.09</b>     | 8.13 $\pm$ 0.97                    | <b>3.70</b> | <b>3.37</b> |
|           | 25                             | 2.62 $\pm$ 0.51                    | 1.09        | 1.08            | 2.90 $\pm$ 0.58                    | <b>5.41</b> | <b>5.43</b> |
| 4         | 100                            | <i>46.40 <math>\pm</math> 4.05</i> | -1.30       | -1.75           | <i>45.60 <math>\pm</math> 4.17</i> | -0.55       | -0.70       |
|           | 87.5                           | 20.52 $\pm$ 2.09                   | -0.21       | -0.80           | 23.11 $\pm$ 2.29                   | 0.79        | 0.87        |
|           | 75                             | 19.05 $\pm$ 2.21                   | <b>4.64</b> | <b>4.03</b>     | 16.27 $\pm$ 1.93                   | <b>2.50</b> | <b>2.52</b> |
|           | 50                             | 11.48 $\pm$ 1.40                   | <b>6.21</b> | <b>6.37</b>     | 9.81 $\pm$ 1.19                    | <b>2.26</b> | 1.91        |
|           | 25                             | 3.48 $\pm$ 0.62                    | <b>3.07</b> | <b>3.10</b>     | 3.86 $\pm$ 0.67                    | <b>4.89</b> | <b>4.98</b> |
| 5         | 100                            | <i>56.06 <math>\pm</math> 6.48</i> | -0.10       | -0.12           | <i>45.45 <math>\pm</math> 5.63</i> | -0.66       | -0.70       |
|           | 87.5                           | 30.48 $\pm$ 2.87                   | 0.19        | 0.39            | 35.29 $\pm$ 3.07                   | -0.02       | -0.06       |
|           | 75                             | 18.08 $\pm$ 1.86                   | 1.02        | 0.57            | 20.25 $\pm$ 2.14                   | <b>4.11</b> | <b>4.35</b> |
|           | 50                             | 12.81 $\pm$ 1.72                   | <b>3.30</b> | <b>3.16</b>     | 11.09 $\pm$ 1.57                   | <b>2.72</b> | <b>3.00</b> |
|           | 25                             | 5.84 $\pm$ 0.88                    | <b>3.70</b> | <b>3.84</b>     | 5.96 $\pm$ 0.91                    | <b>5.19</b> | <b>5.40</b> |
| 12.5      | 1.83 $\pm$ 0.42                | <b>6.25</b>                        | <b>6.19</b> | 2.14 $\pm$ 0.47 | <b>7.05</b>                        | <b>7.03</b> |             |

Notes. Chromosomes 1, 4, and 11 were painted. Bold:  $u$  and  $s$  values are higher than 1.96, indicating overdispersion. Italics: data from undiluted samples obtained previously (12).

of 18,950 cells were scored, in which 2,675 aberrations were recorded. When apparently simple aberrations were considered, the percentages of incomplete translocations ( $23.92 \pm 7.66$ , mean  $\pm$  SD) and dicentrics ( $25.03 \pm 6.85$ ) were very similar, and no dose dependence was observed. In the present study, a total of 315 complex aberrations were observed. When all dilutions were considered jointly for each dose, the percentage of complex aberrations with respect to total aberrations showed a clear dose dependence ( $P < 0.01$ ) (6.55, 9.72, 13.31 and 15.74 for 2, 3, 4 and 5 Gy, respectively).

To evaluate the applicability of FISH painting techniques to the detection of partial-body irradiations, two variables were considered: the ability to detect the expected overdispersion and the similarity between the estimated and known doses of radiation.

For short-term biodosimetry, the aberrations considered were total dicentrics and total translocations. Complex aberrations were included to increase the number of aberrations considered and to reduce the error values. This also allowed a comparison of these results with the results obtained from solid-stained dicentric analysis, where all dicentrics (from simple and complex aberrations) are recorded together.

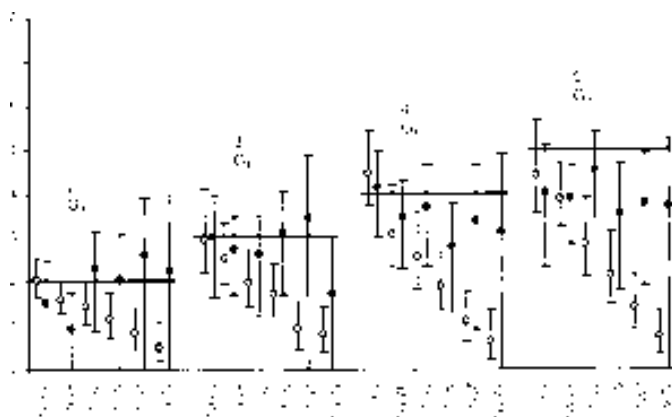
The frequencies of the abnormalities considered for each dose and dilution are shown in Table 2. Results from undiluted samples obtained previously are also shown (12).

As expected, the frequencies of the different abnormalities decreased as the percentages of irradiated cells decreased. Only at 3 Gy did the 12.5% dilution show higher values of translocations with respect to the 25% dilution, but the difference was not significant.

Table 2 also shows the  $u$  and the  $s$  test values. Taking into account the five simulated dilutions and the two chromosome abnormalities considered for each dose, a total of 10  $u$  and  $s$  values per dose were obtained. At 2 Gy, only three of the  $u$  values were higher than 1.96, all of them in the samples with the lowest percentages of irradiated blood (25 and 12.5%). At 3 Gy, four values were higher than 1.96, and at this dose the 50% dilution showed an overdispersion. At 4 and 5 Gy, 8 and 7  $u$  values, respectively, from the samples with the 12.5, 25, 50 and 75% dilutions indicated an overdispersion. The sample with 87.5% irradiated blood did not show an overdispersion at any dose test. When the  $s$  values were compared with the  $u$  values, considerable similarity in the ability to detect the expected overdispersion was observed.

When dose estimations were made for total dicentrics, the  $\chi^2$  value between the real and the estimated doses was 3.65, and in 15 of 20 dilutions, the 95% confidence intervals included the real dose (Fig. 1). For total translocations, the  $\chi^2$  value was 7.08, and in 9 of the 20 dilutions, the 95% confidence intervals included the real dose (Fig. 2). In general, the dose estimated by assuming the irradiation was





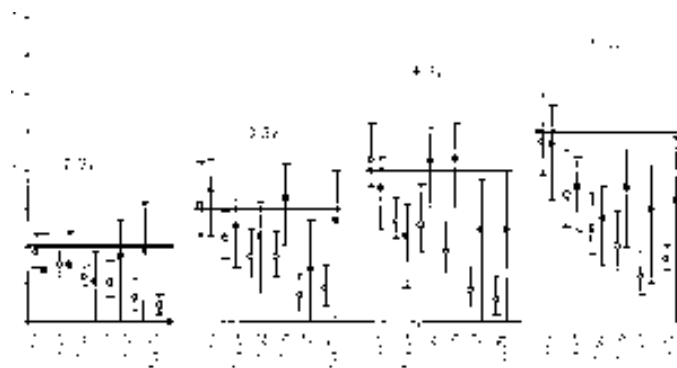
**FIG. 1.** Estimated doses (in Gy) for total dicentric, for each dose (horizontal lines) and each percentage of irradiated blood. Estimated doses and their 95% confidence intervals were calculated by considering the exposures as total-body (empty circles) or as partial-body (full circles). Estimated doses were calculated using the following coefficients:  $C = 0.02 \pm 0.01 (10^{-2})$ ,  $\alpha = 1.13 \pm 0.28 (10^{-2} \text{ Gy}^{-1})$ ,  $\beta = 2.03 \pm 0.19 (10^{-2} \text{ Gy}^{-2})$ .

partial-body (using Dolphin's method) was higher and closer to the real dose than when a whole-body exposure was assumed. The dilutions in which the whole-body dose was higher than the partial-body dose were those showing negative  $u$  or  $s$  values. At these dilutions, the application of Dolphin's method gives estimated frequencies of aberrations that are lower than the observed frequencies.

The disappearance of cells carrying unstable abnormalities with time postirradiation could affect the frequency of translocations in cases of partial-body irradiation (13). For this reason, the  $u$  and  $s$  tests and the dose estimations for total apparently simple translocations were also calculated considering only those cells free of unstable aberrations (Table 3). With this approach, overdispersion was detected in two dilutions at 2 and 3 Gy and in four dilutions at 4 Gy. The estimated whole-body doses were always lower than the whole-body dose estimated by considering all cells analyzed (Fig. 3). This reduction was more evident at higher doses. The estimated doses using Dolphin's method and considering only the cells free of unstable aberrations agreed quite well with the real dose in 13 dilutions, but in the other 7 no dose could be estimated. It must be pointed out that at 5 Gy only the 87.5% dilution could be used to estimate the dose.

## DISCUSSION

In the present study, the frequency of incomplete exchanges for both dicentric and translocations was around 25%, and no dose dependence was observed. The percentages of incomplete exchanges reported in human lymphocytes exposed to low-LET radiation range from 10% to 40% (12, 21–29). When a telomeric PNA probe is used to detect all telomeres, the percentage of true incomplete exchanges falls to approximately 5%. (28, 29). These results



**FIG. 2.** Estimated doses (in Gy) for total translocations, for each dose (horizontal lines) and each percentage of irradiated blood. Estimated doses and their 95% confidence intervals were calculated by considering the exposure as total-body (empty circles) or as partial-body (full circles). Estimated doses were calculated using the following coefficients:  $C = 0.27 \pm 0.04 (10^{-2})$ ,  $\alpha = 2.09 \pm 0.36 (10^{-2} \text{ Gy}^{-1})$ ,  $\beta = 2.05 \pm 0.20 (10^{-2} \text{ Gy}^{-2})$ .

confirm the idea that most incomplete exchanges are not identified as complete exchanges by FISH analysis because of the minimal detectable size for painted and unpainted segments (11.1 and 14.6 Mb, respectively) (30). The lack of dose dependence and the constant frequencies of incomplete exchanges indicate that the inclusion of incomplete endings in quantitative analyses after exposures to low-LET radiations would not change the estimated dose significantly. In fact, in the present study, when dose estimations using complete aberrations were compared using those obtained with total aberrations (complete plus incomplete), no major differences were observed.

In biological dosimetry, one way to distinguish between a partial- and a whole-body exposure to low-LET radiation is to determine whether the distribution of aberrations among cells follows a Poisson distribution. Studies carried out by solid-stained dicentric analyses after simulated partial-body exposures have shown that the  $u$  test is a useful tool to evaluate the distributions of dicentric among cells (31–34). A similar ability has been shown for the premature chromosome condensation (PCC) assay (35, 36).

In the present study, to determine the suitability of FISH painting techniques for partial-body irradiations, the two tests ( $u$  and  $s$  test) used to detect the expected overdispersion give similar results. The contamination by unirradiated cells was detected mainly at high doses and low percentages of irradiated blood. This result contrasts with a previous finding using the same doses and dilutions, carried out by solid-stained dicentric analyses, in which the  $u$  test was always able to detect the overdispersion except for the samples with 87.5% irradiated blood at 2, 3 and 4 Gy (34). By FISH, the fraction of the genome covered by painting chromosomes 1, 4 and 11 is 0.1922 (37), and according to Lucas *et al.* (4), the frequency of exchanges detected between painted and unpainted chromosomes is 31.8% of the total frequency. The low frequency of aberrations and the reduced probability of observing cells with two or more

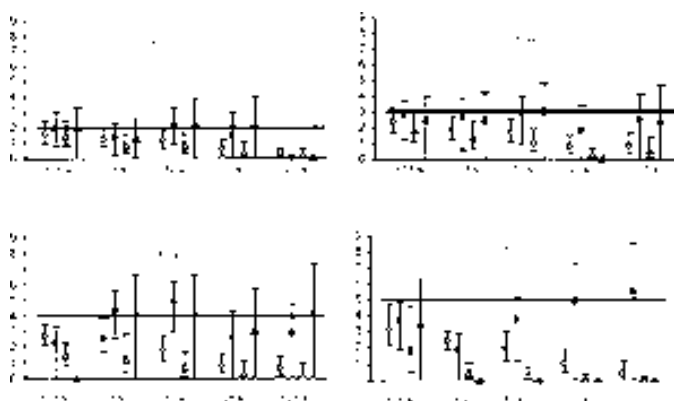
**TABLE 3**  
**Detailed Information on Total Apparently Simple Translocations, for All Cells and for Cells Free of Unstable Abnormalities**

| Dose (Gy) | Percentage of irradiated blood | Cells       | Number of aberrations |           |          | <i>u</i>     | <i>s</i>     | $X/(N - n_0) \pm SE$              | $\lambda$                         | Whole-body dose (Gy) | Partial-body dose |                  |                  |
|-----------|--------------------------------|-------------|-----------------------|-----------|----------|--------------|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|-------------------|------------------|------------------|
|           |                                |             | 1                     | 2         | 3        |              |              |                                   |                                   |                      | (Gy)              | (95% CI)         |                  |
| 2         | 87.5                           | 974         | 63                    | 3         |          | 0.38         | 0.41         | $1.05 \pm 0.03$                   | 0.09                              | 1.61                 | 1.89              | 0; 3.04          |                  |
|           |                                | <b>673</b>  | <b>39</b>             | <b>2</b>  |          | <b>0.57</b>  | <b>0.59</b>  | <b><math>1.05 \pm 0.10</math></b> | <b>0.10</b>                       | <b>1.50</b>          | <b>1.98</b>       | <b>(0; 3.40)</b> |                  |
|           | 75.0                           | 1551        | 73                    | 2         |          | 0.08         | 0.09         | $1.03 \pm 0.02$                   | 0.05                              | 1.25                 | 1.31              | 0; 2.35          |                  |
|           |                                | <b>1227</b> | <b>38</b>             | <b>1</b>  |          | <b>0.46</b>  | <b>0.45</b>  | <b><math>1.03 \pm 0.03</math></b> | <b>0.05</b>                       | <b>0.91</b>          | <b>1.27</b>       | <b>(0; 2.62)</b> |                  |
|           | 50.0                           | 1322        | 53                    | 3         |          | 1.50         | 1.54         | $1.05 \pm 0.03$                   | 0.11                              | 1.16                 | 2.10              | 0; 3.35          |                  |
|           |                                | <b>1131</b> | <b>31</b>             | <b>2</b>  |          | <b>2.03</b>  | <b>2.04</b>  | <b><math>1.06 \pm 0.04</math></b> | <b>0.12</b>                       | <b>0.87</b>          | <b>2.28</b>       | <b>(0; 3.84)</b> |                  |
|           | 25.0                           | 1516        | 29                    | 1         |          | 1.25         | 1.24         | $1.03 \pm 0.03$                   | 0.07                              | 0.61                 | 1.53              | 0; 3.07          |                  |
|           |                                | <b>1427</b> | <b>17</b>             | <b>1</b>  |          | <b>2.54</b>  | <b>2.49</b>  | <b><math>1.06 \pm 0.06</math></b> | <b>0.11</b>                       | <b>0.40</b>          | <b>2.15</b>       | <b>(0; 4.13)</b> |                  |
|           | 12.5                           | 1322        | 16                    |           |          | -0.30        | -0.31        | 1                                 | 0.00                              | 0.36                 | 0                 | 0; 0             |                  |
|           |                                | <b>1274</b> | <b>13</b>             |           |          | <b>-0.25</b> | <b>-0.26</b> | <b>1</b>                          | <b>0.00</b>                       | <b>0.30</b>          | <b>0</b>          | <b>(0; 0)</b>    |                  |
|           | 3                              | 87.5        | 849                   | 91        | 6        | 1            | 0.96         | 0.71                              | $1.08 \pm 0.03$                   | 0.16                 | 2.35              | 2.74             | (1.23; 3.74)     |
|           |                                |             | <b>530</b>            | <b>39</b> | <b>3</b> |              | <b>0.83</b>  | <b>0.89</b>                       | <b><math>1.07 \pm 0.04</math></b> | <b>0.14</b>          | <b>1.82</b>       | <b>2.52</b>      | <b>(0; 3.95)</b> |
| 75.0      |                                | 824         | 60                    | 5         |          | 1.21         | 1.31         | $1.08 \pm 0.03$                   | 0.15                              | 1.83                 | 2.64              | (0.52; 3.84)     |                  |
|           |                                | <b>564</b>  | <b>26</b>             | <b>2</b>  |          | <b>1.40</b>  | <b>1.42</b>  | <b><math>1.07 \pm 0.05</math></b> | <b>0.14</b>                       | <b>1.32</b>          | <b>2.52</b>       | <b>(0; 4.21)</b> |                  |
| 50.0      |                                | 1009        | 64                    | 6         |          | 1.89         | 2.02         | $1.09 \pm 0.04$                   | 0.17                              | 1.68                 | 2.82              | (0.90; 3.98)     |                  |
|           |                                | <b>850</b>  | <b>27</b>             | <b>3</b>  |          | <b>3.02</b>  | <b>3.06</b>  | <b><math>1.10 \pm 0.06</math></b> | <b>0.19</b>                       | <b>1.04</b>          | <b>3.09</b>       | <b>(0; 4.77)</b> |                  |
| 25.0      |                                | 1070        | 24                    | 1         |          | 1.26         | 1.25         | $1.04 \pm 0.04$                   | 0.08                              | 0.71                 | 1.74              | (0; 3.42)        |                  |
|           |                                | <b>980</b>  | <b>10</b>             |           |          | <b>-0.21</b> | <b>-0.23</b> | <b>1</b>                          | <b>0.00</b>                       | <b>0.30</b>          | <b>0</b>          | <b>(0; 0)</b>    |                  |
| 12.5      |                                | 1096        | 28                    | 2         |          | 2.30         | 2.30         | $1.07 \pm 0.05$                   | 0.13                              | 0.83                 | 2.42              | (0; 4.05)        |                  |
|           |                                | <b>1049</b> | <b>14</b>             | <b>1</b>  |          | <b>2.62</b>  | <b>2.55</b>  | <b><math>1.07 \pm 0.07</math></b> | <b>0.13</b>                       | <b>0.46</b>          | <b>2.42</b>       | <b>(0; 4.57)</b> |                  |
| 4         |                                | 87.5        | 463                   | 65        | 2        | 1            | -0.22        | -0.63                             | $1.06 \pm 0.03$                   | 0.12                 | 2.70              | 2.23             | (0; 3.39)        |
|           |                                |             | <b>195</b>            | <b>12</b> |          |              | <b>-0.58</b> | <b>-0.63</b>                      | <b>1</b>                          | <b>0.00</b>          | <b>1.46</b>       | <b>—</b>         | <b>(0; 0)</b>    |
|           | 75.0                           | 504         | 51                    | 9         | 1        | 3.08         | 3.03         | $1.18 \pm 0.06$                   | 0.34                              | 2.56                 | 4.33              | (2.51; 5.59)     |                  |
|           |                                | <b>274</b>  | <b>10</b>             | <b>2</b>  |          | <b>2.90</b>  | <b>2.88</b>  | <b><math>1.17 \pm 0.12</math></b> | <b>0.32</b>                       | <b>1.28</b>          | <b>4.14</b>       | <b>(0; 6.62)</b> |                  |
|           | 50                             | 775         | 43                    | 10        | 1        | 6.15         | 5.93         | $1.22 \pm 0.07$                   | 0.42                              | 1.83                 | 4.85              | (2.95; 6.18)     |                  |
|           |                                | <b>571</b>  | <b>10</b>             | <b>2</b>  |          | <b>4.61</b>  | <b>4.51</b>  | <b><math>1.17 \pm 0.12</math></b> | <b>0.32</b>                       | <b>0.72</b>          | <b>4.14</b>       | <b>(0; 6.62)</b> |                  |
|           | 25.0                           | 1035        | 25                    | 2         |          | 2.57         | 2.57         | $1.07 \pm 0.05$                   | 0.14                              | 0.80                 | 2.58              | (0; 4.30)        |                  |
|           |                                | <b>923</b>  | <b>9</b>              | <b>1</b>  |          | <b>3.85</b>  | <b>3.69</b>  | <b><math>1.10 \pm 0.10</math></b> | <b>0.19</b>                       | <b>0.36</b>          | <b>3.09</b>       | <b>(0; 5.68)</b> |                  |
|           | 12.5                           | 1040        | 20                    | 2         |          | 3.37         | 3.34         | $1.09 \pm 0.07$                   | 0.18                              | 0.68                 | 2.92              | (0; 4.81)        |                  |
|           |                                | <b>965</b>  | <b>5</b>              | <b>1</b>  |          | <b>6.63</b>  | <b>6.15</b>  | <b><math>1.17 \pm 0.17</math></b> | <b>0.32</b>                       | <b>0.19</b>          | <b>4.14</b>       | <b>(0; 7.37)</b> |                  |
|           | 5                              | 87.5        | 374                   | 57        | 9        |              | 0.58         | 0.84                              | $1.14 \pm 0.05$                   | 0.26                 | 3.16              | 3.70             | (1.89; 4.91)     |
|           |                                |             | <b>107</b>            | <b>7</b>  | <b>1</b> |              | <b>1.15</b>  | <b>1.10</b>                       | <b><math>1.12 \pm 0.13</math></b> | <b>0.24</b>          | <b>1.81</b>       | <b>3.52</b>      | <b>(0; 6.39)</b> |
| 75.0      |                                | 553         | 67                    | 3         |          | -0.80        | -0.82        | $1.04 \pm 0.02$                   | 0.08                              | 2.43                 | 1.82              | (0; 2.94)        |                  |
|           |                                | <b>389</b>  | <b>6</b>              |           |          | <b>-0.20</b> | <b>-0.22</b> | <b>1</b>                          | <b>0.00</b>                       | <b>0.47</b>          | <b>0</b>          | <b>(0; 0)</b>    |                  |
| 50.0      |                                | 523         | 38                    | 4         | 1        | 3.17         | 2.69         | $1.14 \pm 0.06$                   | 0.27                              | 1.95                 | 3.75              | (1.27; 5.21)     |                  |
|           |                                | <b>424</b>  | <b>4</b>              |           |          | <b>-0.12</b> | <b>-0.14</b> | <b>1</b>                          | <b>0.00</b>                       | <b>0.27</b>          | <b>0</b>          | <b>(0; 0)</b>    |                  |
| 25.0      |                                | 890         | 28                    | 4         |          | 3.92         | 3.98         | $1.13 \pm 0.06$                   | 0.24                              | 1.07                 | 3.52              | (0; 5.17)        |                  |
|           |                                | <b>828</b>  | <b>3</b>              |           |          | <b>-0.06</b> | <b>-0.07</b> | <b>1</b>                          | <b>0.00</b>                       | <b>0.04</b>          | <b>0</b>          | <b>(0; 0)</b>    |                  |
| 12.5      |                                | 1260        | 10                    | 3         |          | 9.42         | 9.19         | $1.23 \pm 0.14$                   | 0.43                              | 0.38                 | 4.95              | 0; 7.37          |                  |
|           |                                | <b>1216</b> | <b>1</b>              |           |          | <b>—</b>     | <b>-0.02</b> | <b>1</b>                          | <b>0.00</b>                       | <b>0</b>             | <b>0</b>          | <b>(0; 0)</b>    |                  |

Notes. Bold: information considering only those cells free of unstable aberrations.  $\lambda$ , frequency of aberrations in the irradiated fraction.  $X/(N - n_0)$ , aberrations among cells with aberrations. Dose estimations were made using the following coefficients:  $C = 0.27 \pm 0.05 (10^{-2})$ ,  $\alpha = 2.09 \pm 0.34 (10^{-2} \text{ Gy}^{-1})$ ,  $\beta = 1.32 \pm 0.18 (10^{-2} \text{ Gy}^{-2})$ .

aberrations explain in part why the two tests used to check the Poisson distribution are unable to detect the overdispersion at the lowest doses. The inability to detect overdispersion could be overcome by increasing the number of cells analyzed. However, in the present study using FISH, the numbers of equivalent cells analyzed are similar to the numbers of cells analyzed in the previous study with solid-stained dicentrics. This indicates that the number of equivalent cells to be analyzed by FISH to obtain a similar degree of detection of overdispersion should always be higher than the number of cells analyzed by solid staining. The

inability to detect overdispersion is also due to the percentage of irradiated blood (see Table 2). This can be understood when the *s* test to evaluate the zero-inflated Poisson model is considered. The *s* test checks the extra proportion of cells without aberrations. The percentage of unexposed blood needed to produce a detectable increase in the proportion of cells without aberrations is higher with FISH painting techniques than with solid-stained dicentric analyses and when the percentage of exposed blood is higher than 75%, it may be difficult to distinguish between a partial-body and a whole-body irradiation. This result is in



**FIG. 3.** Estimated doses (in Gy) for total apparently simple translocations. Empty and full circles represent whole- and partial-body dose estimations with their 95% confidence intervals considering all cells analyzed. Empty and full triangles represent whole- and partial-body dose estimations with their 95% confidence intervals considering only those cells free of unstable abnormalities. Estimated doses were calculated using the following coefficients:  $C = 0.27 \pm 0.05 (10^{-2})$ ,  $\alpha = 2.09 \pm 0.34 (10^{-2} \text{ Gy}^{-1})$ ,  $\beta = 1.32 \pm 0.18 (10^{-2} \text{ Gy}^{-2})$ .

contrast with the results of Guerrero-Carbajal *et al.* (13). That study, where FISH techniques were used to analyze a 90% simulated partial-body irradiation at 4 Gy, the overdispersion was always detected except for translocations in the 72-h culture.

When dose estimations were made, the total dicentric detected by FISH showed better agreement between the real and the estimated doses than total translocations. For short-term biodosimetry, the results obtained previously by analysis of solid-stained dicentrics were more accurate, because in that study, in all 20 dilutions, the 95% confidence intervals of the estimated doses included the real dose of radiation. This indicates that the technique to choose just after an exposure is solid-stained dicentric analysis. However, the results of the present study indicate that dose estimations in cases of partial-body exposures can also be assessed by FISH painting techniques and that in follow-up studies using FISH, the interpretation of the distribution of translocations among cells could be of interest.

The frequency of cells with unstable abnormalities tends to decrease during the renewal of the lymphocyte pool. On the other hand, it has been reported that the yield of translocations remains relatively constant as the time postirradiation increases (38–43). For this reason, the suitability of FISH painting techniques to assess partial-body irradiations has also been determined by considering only the total yield of apparently simple translocations in cells free of unstable abnormalities. In this case, the detection of overdispersion by the  $u$  and  $s$  tests and the accuracy of dose estimation is dramatically reduced in comparison to the results obtained by considering all cells. For example, at 5 Gy, none of the dilutions showed overdispersion, and in four of five dilutions, the dose could not be estimated. This is because there were no cells free of unstable abnormalities that had two or more translocations. Although a real exposure is more com-

plicated, the results presented here could explain some observations in studies carried out after real exposures, where an influence of the dose on the persistence of translocations has been reported (44–46). As can be seen in Table 3 and Fig. 3, at long times after partial-body exposures, the estimation of the whole-body dose will tend to be lower when the dose was higher.

In conclusion, for short-term biodosimetry, the suitability of FISH painting to detect partial-body irradiations is compromised, as expected, because of the reduction in the frequency of aberrations that can be detected by scoring only three chromosomes. For the reconstruction of past doses in cases of partial-body exposures, the accuracy of the dose assessment is reduced even more because the disappearance of cells carrying unstable abnormalities affects the frequency of translocations, especially at higher doses.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work received financial support from the Spanish Ministerio de Educación y Cultura (PM98-0168) and Consejo de Seguridad Nuclear (exp. 246/96) and from the Generalitat de Catalunya (SGR 00061, 1998).

Received: July 3, 2001; accepted: November 19, 2001

#### REFERENCES

1. D. Beninson, D. C. Lloyd, A. T. Natarajan, G. Obe, R. J. Preston and M. S. Sasaki, *Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment*. Technical Reports Series no. 260, IAEA, Vienna, 1986.
2. G. W. Dolphin, Biological dosimetry with particular reference to chromosomal aberration analysis. A review of methods. In *Handling of Radiation Accidents*, pp. 215–224. STI/PUB/229, IAEA, Vienna, 1969.
3. M. S. Sasaki and H. Miyata, Biological dosimetry in atomic bomb survivors. *Nature* **220**, 1189–1193 (1968).
4. J. N. Lucas, A. Awa, T. Straume, M. Poggensee, Y. Kodama, M. Nakano, K. Ohtaki, H-U. Weier, D. Pinkel and G. Littlefield, Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **62**, 53–63 (1992).
5. J. D. Tucker, M. J. Ramsey, D. A. Lee and J. L. Minkler, Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.* **64**, 27–37 (1993).
6. M. Bauchinger, E. Schmid, H. Zitzelsberger, H. Braselman and U. Nahrstedt, Radiation-induced chromosome aberrations analysed by two-colour fluorescence *in situ* hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe. *Int. J. Radiat. Biol.* **64**, 179–184 (1993).
7. T. Straume and J. N. Lucas, A comparison of the yields of translocations and dicentrics measured using fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.* **64**, 185–187 (1993).
8. J. D. Tucker, D. A. Lee and D. H. Moore, Validation of chromosome painting. II. A detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.* **67**, 19–28 (1995).
9. M. Bauchinger, Cytogenetic research after accidental radiation exposure. *Stem Cells* **13** (Suppl. 1), 182–190 (1995).
10. E. Schmid, H. Braselmann and U. Nahrstedt, Comparison of  $\gamma$ -ray induced dicentric yields in human lymphocytes measured by conventional analysis and FISH. *Mutat. Res.* **348**, 125–130 (1995).
11. C. Lindholm, S. Luomahaara, A. Korvistoinen, T. Iilus, A. A. Edwards and S. Salomaa, Comparison of dose-response curves for chromosomal aberrations established by chromosome painting and conventional analysis. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 27–34 (1998).

12. J. F. Barquinero, S. Cigarrán, M. R. Caballn, H. Braselmann, M. Ribas, J. Egozcue and L. Barrios, Comparison of x-ray dose-response curves obtained by chromosome painting, using conventional and PAINT nomenclatures. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 1557–1566 (1999).
13. Y. C. Guerrero-Carbajal, J. E. Moquet, A. A. Edwards and D. C. Lloyd, The persistence of FISH translocations for retrospective biological dosimetry after simulated whole or partial body irradiation. *Radiat. Prot. Dosim.* **76**, 159–168 (1998).
14. S. Cigarrán, J. F. Barquinero, L. Barrios, M. Ribas, J. Egozcue and M. R. Caballn, Cytogenetic analyses by FISH in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Radiat. Res.* **155**, 417–423 (2001).
15. J. D. Tucker, W. F. Morgan, A. A. Awa, M. Bauchinger, D. Blakey, M. N. Cornforth, L. G. Littlefield, A. T. Natarajan and C. Shasserre, A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenet. Cell. Genet.* **68**, 211–221 (1995).
16. S. Knehr, H. Zitzelsberger and M. Bauchinger, FISH-based analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using different nomenclature systems. *Int. J. Radiat. Biol.* **73**, 135–141 (1998).
17. C. R. Rao and I. M. Chakravarti, Some small sample tests of significance for a Poisson distribution. *Biometrics* **12**, 264–282 (1956).
18. J. R. K. Savage, Sites of radiation induced chromosome exchanges. *Curr. Top. Radiat. Res.* **6**, 129–194 (1970).
19. A. A. Edwards, D. C. Lloyd and R. J. Purrot, Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution. *Radiat. Environ. Biophys.* **16**, 89–100 (1979).
20. D. Böhning, Zero-inflated Poisson models and C. A. M. A. N: A tutorial collection of evidence. *Biom. J.* **40**, 833–843 (1998).
21. A. T. Natarajan, R. C. Vyas, F. Darroudi and S. Vermeulen, Frequencies of X-ray-induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by *in situ* hybridization using chromosome-specific DNA libraries. *Int. J. Radiat. Biol.* **61**, 199–203 (1992).
22. J. D. Tucker and J. R. Senft, Analysis of naturally occurring and radiation-induced breakpoint locations in human chromosomes 1, 2 and 4. *Radiat. Res.* **140**, 31–36 (1994).
23. P. Finnon, D. C. Lloyd and A. A. Edwards, Fluorescence *in situ* hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: Applicability to biological dosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.* **68**, 429–435 (1995).
24. P. J. Simpson and J. R. K. Savage, Estimating the true frequency of X-ray-induced complex chromosome exchanges using fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.* **67**, 37–45 (1995).
25. M. Durante, K. George, H. Wu and T. C. Yang, Rejoining and mis-rejoining of radiation-induced chromatin breaks. I. Experiments with human lymphocytes. *Radiat. Res.* **145**, 274–280 (1996).
26. S. Knehr, H. Zitzelsberger, H. Braselmann, U. Nahrstedt and M. Bauchinger, Chromosome analysis by fluorescence *in situ* hybridization: Further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.* **70**, 385–392 (1996).
27. J. F. Barquinero, S. Knehr, H. Braselmann, M. Figel and M. Bauchinger, DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence *in situ* hybridisation (FISH)-painting of all chromosomes of a human female karyotype. nomenclatures *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 315–323 (1998).
28. J. J. W. A. Boei, S. Vermeulen, J. Fomina and A. T. Natarajan, Detection of incomplete exchanges and interstitial fragments in X-irradiated human lymphocytes using a telomeric PNA probe. *Int. J. Radiat. Biol.* **73**, 599–603 (1998).
29. J. Fomina, F. Darroudi, J. J. W. A. Boei and A. T. Natarajan, Discrimination between complete and incomplete chromosome exchanges in X-irradiated human lymphocytes using FISH with pan-centromeric and chromosome specific DNA probes in combination with telomeric PNA probe. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 807–813 (2000).
30. Y. Kodama, M. Nakano, K. Ohtaki, R. Delongchamp, A. A. Awa and N. Nakamura, Estimation of minimal size of translocated chromosome segments detectable by fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.* **71**, 35–39 (1997).
31. D. C. Lloyd, R. J. Purrot and G. W. Dolphin, Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation. *Phys. Med. Biol.* **18**, 421–431 (1973).
32. D. C. Lloyd, A. A. Edwards, J. S. Prosser, N. Barjaktarovic, J. K. Brown, D. Horvat, S. R. Ismail, G. J. Köteles, Z. Almasy and M. S. Sasaki, A collaborative exercise on cytogenetic dosimetry for simulated whole and partial body accidental irradiation. *Mutat. Res.* **179**, 197–208 (1987).
33. D. C. Lloyd, A. A. Edwards, A. T. Natarajan and F. Darroudi, Biological dosimetry applied to *in vitro* simulated partial body irradiation. In *Treatment and Biological Dosimetry of Exposed Persons: Post-Chernobyl Action* (K. Chadwick and G. Gerber, Eds.), pp. 51–80. Report No. EUR 12558, Commission of the European Communities, Luxembourg, 1991.
34. J. F. Barquinero, L. Barrios, M. R. Caballn, R. Miró, M. Ribas and J. E. Egozcue, Biological dosimetry in simulated *in vivo* partial irradiations. *Int. J. Radiat. Biol.* **71**, 435–440 (1997).
35. W. F. Blakely, P. G. S. Prasanna, C. J. Kolanko, M. D. Pyle, D. M. Mosbrook, A. S. Loats, T. L. Rippeon and H. Loats, Application of the premature chromosome condensation assay in simulated partial-body radiation exposures: Evaluation of the use of an automated metaphase-finder. *Stem Cells* **13** (Suppl. 1), 223–230 (1995).
36. F. Darroudi, A. T. Natarajan, P. A. J. Bentvelzen, P. J. Heidt, A. Van Rotterdam, J. Zoetelief and J. J. Broerse, Detection of total- and partial-body irradiation in a monkey model: A comparative study of chromosomal aberration, micronucleus and premature chromosome condensation assays. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 207–215 (1998).
37. N. E. Morton, Parameters of the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7474–7476 (1991).
38. T. Straume, J. N. Lucas, J. D. Tucker, W. R. Bigbee and R. D. Langlois, Biodosimetry for a radiation worker using multiple assays. *Health Phys.* **16**, 122–130 (1992).
39. K. Salassidis, V. Georgiadou-Schumacher, H. Braselmann, P. Muller, R. U. Peter and M. Bauchinger, Chromosome painting in highly irradiated Chernobyl victims: A follow-up study to evaluate the stability of symmetrical translocations and the influence of clonal aberrations for retrospective dose estimation. *Int. J. Radiat. Biol.* **68**, 257–262 (1995).
40. A. T. Natarajan, A. S. Balajee, J. J. W. A. Boei, F. Darroudi, I. Dominguez, M. P. Hande, M. Meijers, P. Slijepcevic, S. Vermeulen and Y. Xiao, Mechanisms of induction of chromosomal aberrations and their detection by fluorescence *in situ* hybridization. *Mutat. Res.* **372**, 247–258 (1996).
41. D. C. Lloyd, J. E. Moquet, S. Oram, A. A. Edwards and J. N. Lucas, Accidental intake of tritiated water: a cytogenetic follow-up case on translocation stability and dose reconstruction. *Int. J. Radiat. Biol.* **73**, 543–547 (1998).
42. K. Matsumoto, M. J. Ramsey, D. O. Nelson and J. D. Tucker, Persistence of radiation-induced translocations in human peripheral blood determined by chromosome painting. *Radiat. Res.* **149**, 602–613 (1998).
43. Y. Xiao, F. Darroudi, M. Grigorova and A. T. Natarajan, Induction and persistence of chromosomal exchanges in mouse bone marrow cells following whole-body exposure to X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 1119–1128 (1999).
44. A. T. Natarajan, S. J. Santos, F. Darroudi, V. Hadjidikova, S. Vermeulen, S. Chatterjee, M. V. D. Berg, M. Grigorova, E. T. Sakamoto-Hojo and M. P. Curado, <sup>137</sup>Cs-induced chromosome aberrations analyzed by fluorescence *in situ* hybridization: eight years follow up of the Goiania radiation accident victims. *Mutat. Res.* **400**, 299–312 (1998).
45. S. Pressl, H. Romm, B. B. Ganguly and G. Stephan, Experience with FISH-detected translocations as an indicator in retrospective dose reconstruction. *Radiat. Prot. Dosim.* **88**, 45–49 (2000).
46. M. Bauchinger, E. Schmid and H. Braselmann, Time-course of translocation and dicentric frequencies in a radiation accident case. *Int. J. Radiat. Biol.* **77**, 553–557 (2001).

## Persistence of Radiation-Induced Chromosome Aberrations in a Long-Term Cell Culture

Assumpta Duran,<sup>a</sup> Joan Francesc Barquinero,<sup>b</sup> María Rosa Caballín,<sup>b</sup> Montserrat Ribas<sup>c</sup> and Leonardo Barrios<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup> Unitat de Biologia Cel·lular, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain, <sup>b</sup> Unitat d'Antropologia Biològica, Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain; and <sup>c</sup> Servei de Radiofísica i Radioprotecció de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain

Duran, A., Barquinero, J. F., Caballín, M. R., Ribas, M. and Barrios, L. Persistence of Radiation-Induced Chromosome Aberrations in a Long-Term Cell Culture. *Radiat. Res.* **171**, 425–437 (2009).

The aim of the present study was to evaluate the persistence of chromosome aberrations induced by X rays. FISH painting and mFISH techniques were applied to long-term cultures of irradiated cells. With painting, at 2 Gy the frequency of apparently simple translocations remained almost invariable during all the culture, whereas at 4 Gy a rapid decline was observed between the first and the second samples, followed by a slight decrease until the end of the culture. Apparently simple dicentric and complex aberrations disappeared after the first sample at 2 and 4 Gy. By mFISH, at 2 Gy the frequency of complete plus one-way translocations remained invariable between the first and last sample, but at 4 Gy a 60% decline was observed. True incomplete simple translocations disappeared at 2 and 4 Gy, indicating that incompleteness could be a factor to consider when the persistence of translocations is analyzed. The analysis by mFISH showed that the frequency of complex aberrations and their complexity increased with dose and tended to disappear in the last sample. Our results indicate that the influence of dose on the decrease in the frequency of simple translocations with time postirradiation cannot be fully explained by the disappearance of true incomplete translocations and complex aberrations. The chromosome involvement was random for radiation-induced exchange aberrations and non-random for total aberrations. Chromosome 7 showed the highest deviations from expected, being less and more involved than expected in the first and last samples, respectively. Some preferential chromosome-chromosome associations were observed, including a coincidence with a cluster from radiogenic chromosome aberrations described in other studies. © 2009 by Radiation Research Society

### INTRODUCTION

The analysis of dicentric chromosomes is the biological method of choice to estimate the dose in cases of recent

<sup>1</sup> Address for correspondence: Unitat de Biologia Cel·lular, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, e-mail: Leonard.Barrios@uab.cat.

acute exposures to ionizing radiation (1). The dicentric is an unstable chromosome aberration, and its frequency decreases with time postirradiation, so its usefulness in retrospective studies is compromised (2–5). Translocations, which are induced by radiation at a frequency similar to that of dicentrics and are easily detected by FISH techniques, are considered stable chromosome aberrations and are useful for retrospective studies (1, 6). However, a decline with time in the frequency of translocations has been described in individuals irradiated at high doses (7–9). A factor contributing to this decline is the co-occurrence of translocations and unstable aberrations in the same cell (5, 6, 10–16). Another factor to be considered is the type of translocation scored. Using FISH painting, one- and two-way apparently simple translocations and translocations deriving from complex aberrations can be detected (17). From these, it has been determined that two-way translocations are the most stable over time (18, 19).

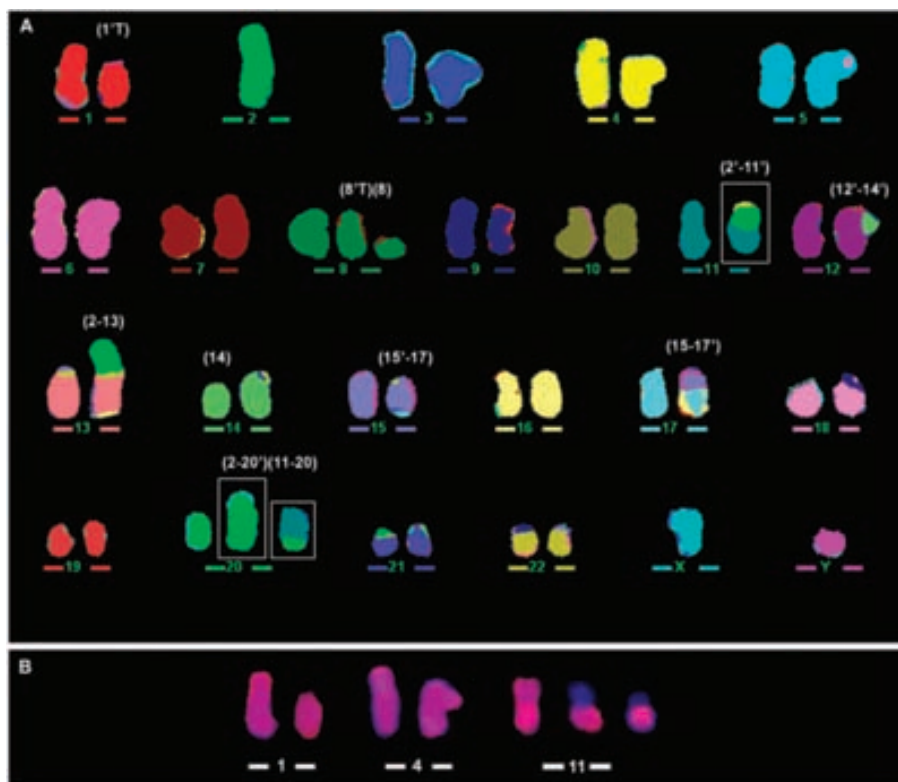
Some complex exchanges are undetectable or are misclassified as simple ones when FISH painting is applied (20–22). The detection of complex aberrations has been improved by multiplex FISH (mFISH) or spectral karyotyping (SKY) techniques (23–29). Moreover, with these techniques, the involvement of each chromosome in exchange-type aberrations can be studied, allowing the analysis of the proximity effect in the formation of exchange chromosome aberrations (30, 31).

The aim of the present study was to evaluate how the frequencies of different chromosome aberrations induced by ionizing radiation vary with time after exposure. For this purpose, FISH painting and mFISH techniques were used to study long-term cultures of irradiated cells. In addition, the involvement of each chromosome in radiation-induced chromosome aberrations was analyzed after irradiation and at the end of the long-term culture.

### MATERIAL AND METHODS

#### *Cell Culture and Irradiation Conditions*

The present study was performed with cells of the cell line Jurkat, which was derived from a human lymphoblastic T-cell leukemia. Jurkat



**FIG. 1.** Panel A: Pseudo-colored mFISH karyotype of an aberrant cell showing (2'-11') (2-20') (2-13) (11-20), (15'-17') (15-17'), (12'-14') (14), (8'T)(8), (1'T). Squares indicate the complex aberration in which chromosome 11 is involved. Panel B: Partial karyotype recreation of FISH painting of chromosomes 1, 4 and 11. With this methodology the aberration affecting painted chromosomes is classified as a dic(BA) ace(ab), an apparently simple dicentric.

cells were cultured in suspension at 37°C in a 95% air/5% CO<sub>2</sub> atmosphere in RPMI 1640 medium (Gibco, Invitrogen, Barcelona, Spain) supplemented with 15% fetal calf serum (Gibco), L-glutamine (Gibco) and antibiotics (Gibco). To synchronize cells at G<sub>0</sub>, they were cultured without serum the last 24 h before freezing (32). Thawed cells were placed in complete culture medium for 2 h at 37°C and irradiated with 0.2, 2 and 4 Gy of X rays (dose rate 0.27 Gy min<sup>-1</sup>) following IAEA recommendations (1). The beam quality of the X-ray source corresponds to a half-value layer of 1.43 mm copper (180 kV, 9 mA, 0.5 mm copper filtration). After irradiation, the cells were cultured for 2–3 weeks. The first sample of all cultures was harvested 48 h after irradiation, and the remaining samples were collected at different times according to their optimum growth. Culture times corresponded to 7, 7, 12 and 10 cell population doublings in the control and the 0.2-, 2- and 4-Gy irradiated cultures, respectively. To carry out the cytogenetic analysis, colcemid (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) (0.3 µg ml<sup>-1</sup>) was added to each sample 2 h before harvesting. Then the cells were treated with hypotonic solution at room temperature for 1 min and fixed with Carnoy's solution.

#### FISH Painting Technique

Cy3-labeled probes for whole chromosomes 1, 4 and 11 (Cambio, Cambridge, UK) and an FITC-labeled pancentromeric probe (Cambio) were used. Slides were dehydrated in 70%, 85% and 100% ethanol for 2 min each and air-dried. A mixture of 2 µl of each painting DNA probe and 20 µl of the pancentromeric probe was applied onto slides. Chromosome spreads and probes were denatured at 69°C for 3 min and incubated at 40°C for 24 h in a Vysis HYBrite plaque (Abbott Molecular Inc., Downers Grove, IL). Then the slides were washed with 1× SSC at 73°C for 5 min, 2× SSC/Tween20 at room temperature for 5 min, and 4× SSC/Tween20 at room temperature for 5 min. DAPI (4-6-diamidino-2-phenylindole) (Abbott Molecular Inc.) was applied as a counterstain.

#### mFISH Technique

mFISH analyses were done on the first and last samples collected from the control and the 2- and 4-Gy irradiated cultures. Before mFISH, solid staining was performed to select spreads with a sufficient number of good-quality metaphases. Images of these metaphases were digitalized to perform mFISH analysis in the same cells (Cytovision FISH workstation, Applied Imaging, Newcastle upon Tyne, UK). Slides were destained in ethanol (70%, 85%, 100%, 85% and 70%, 1 min each) and air-dried. Pre-hybridization and hybridization treatments with the Vysis Spectra Vysion Assay (Abbott Molecular Inc.) were carried out according to the manufacturer's protocol.

#### Scoring Criteria for FISH Painting

Metaphases were analyzed using an Olympus BX-60 epifluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with DAPI, FITC, Cy3 and a triple band-pass filter. Only metaphases with 46 centromeres were scored. A metaphase was classified as normal if none of the painted chromosomes were involved in a chromosome-type aberration. Aberrations were described according to the modified PAINT nomenclature (21, 33). Simple exchanges were those resulting from two breaks and complex ones were those resulting from at least three breaks in two or more chromosomes.

#### Scoring Criteria for mFISH

Metaphases were analyzed using an Olympus BX-60 epifluorescence microscope (Olympus) equipped with a specific filter set for Aqua, Cy5, FITC, Gold, Texas Red and DAPI. Images for each fluorochrome were digitalized and analyzed by the Cytovision 2.7 software (Applied Imaging). Chromosome aberrations were described by the mPAINT nomen-

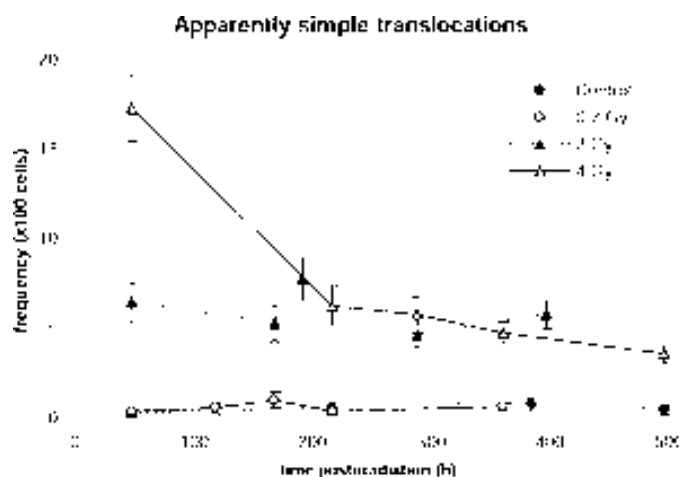


FIG. 2. Frequencies of apparently simple translocations (AST) in the control cultures (full circles, dotted line) and in the cultures irradiated with 0.2 (empty circles, solid line), 2 (full triangles, dotted line), and 4 Gy (empty triangles, solid line). Standard errors (SE) were calculated assuming the Poisson distribution, confirmed in all cases by the *U* test (71).

clature (22) and classified as exchange or non-exchange. Non-exchange aberrations were classified as true terminal deletion (TTD), truncated centric chromosome accompanied by the corresponding acentric fragment; lone truncated chromosome (LTChr), without a visible associated linear acentric fragment; and lone linear acentric fragment (LLAF), not associated with an obvious truncation of its corresponding centric piece (24).

Exchange aberrations were classified as simple or complex. Simple exchanges were considered as complete when all the pieces were re-joined, as incomplete when all the pieces were visible but at least one appeared to be unrejoined, and as one-way when a piece was missing. The complex exchanges were assigned to the most conservative C/A/B system in terms of the minimum number of chromosomes, arms and breaks involved (17). The use of mFISH allows the detection complex aberrations that could be misclassified as simple ones by FISH painting (Fig. 1). Complex aberrations were reduced into independent exchange events called "cycles" (34). When more than one cycle structure was possible, the minimum obligate cycle structure was chosen (22, 24).

## RESULTS

A preliminary cytogenetic study of the Jurkat cells was done by DAPI reverse banding in 100 metaphases, showing a diploid karyotype with 46 chromosomes and no apparent exchange aberrations. Moreover, in the preliminary study, no exchanges were observed by mFISH.

### FISH Painting

In the control and irradiated cultures, a total of 13,744 cells were analyzed with a minimum of 500 cells per sample. Figures 2–4 show the variation with time postirradiation of the frequencies  $\pm$  SE ( $\times 100$ ) of apparently simple translocations (AST), apparently simple dicentrics (ASD), and complex aberrations, respectively. Compared with the control culture, at 0.2 Gy, the first sample (48 h after irradiation) showed a slight but nonsignificant increase for AST ( $0.20 \pm 0.20$  compared to  $0.32 \pm 0.18$ ) and ASD ( $0.00 \pm 0.00$  compared to  $0.64 \pm 0.26$ ). At 2 Gy, in the

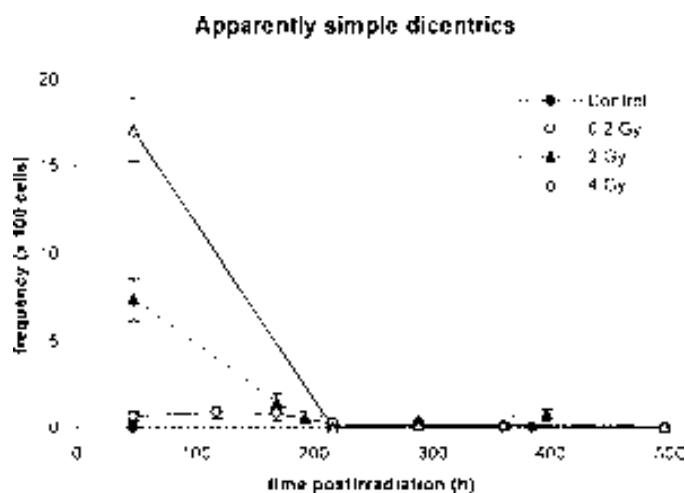


FIG. 3. Frequencies of apparently simple dicentrics (ASD) in the control cultures (full circles, dotted line) and in the cultures irradiated with 0.2 (empty circles, solid line), 2 (full triangles, dotted line), and 4 Gy (empty triangles, solid line). Standard errors (SE) were calculated assuming the Poisson distribution, confirmed in all cases by the *U* test (71).

first sample, the yields  $\pm$  SE ( $\times 100$ ) of chromosome aberrations were  $6.41 \pm 1.12$  for AST,  $7.38 \pm 1.20$  for ASD, and  $1.75 \pm 0.58$  for complex aberrations, all of which were significantly higher than those observed in the control culture ( $P < 0.01$  in all cases, Student's *t* test). At this dose the frequency  $\pm$  SE ( $\times 100$ ) of AST remained almost invariable until the end of the culture ( $5.77 \pm 0.74$ ), while the frequencies  $\pm$  SE ( $\times 100$ ) of ASD and complex aberrations showed a progressive decline with time, reaching values near zero in the 192-h sample. In the culture irradiated with 4 Gy, the frequency  $\pm$  SE ( $\times 100$ ) of AST showed an abrupt decrease from  $17.28 \pm 1.89$  in the first sample to  $6.21 \pm 1.10$  at 216 h and then showed a slight decrease until the last sample ( $3.53 \pm 0.49$ ). For ASD and

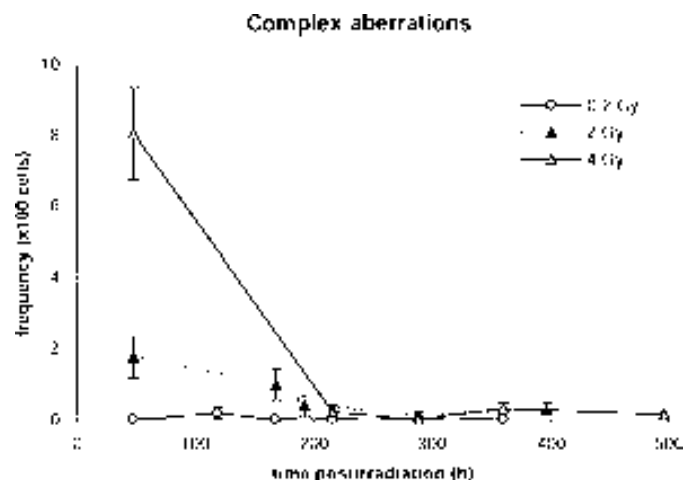


FIG. 4. Frequencies of complex aberrations in the cultures irradiated with 0.2 (empty circles, solid line), 2 (full triangles, dotted line), and 4 Gy (empty triangles, solid line). Standard errors (SE) were calculated assuming the Poisson distribution, confirmed in all cases by the *U* test (71).

**TABLE 1**  
**Chromosome Aberrations Observed by mFISH**

|                                 | Control first          | Control last           | 2 Gy first               | 2 Gy last               | 4 Gy first              | 4 Gy last               |
|---------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Cells scored                    | 101                    | 84                     | 152                      | 83                      | 71                      | 124                     |
| Damaged cells                   | 4%                     | 8%                     | 63%                      | 28%                     | 76%                     | 17%                     |
| <b>NON-EXCHANGE ABERRATIONS</b> |                        |                        |                          |                         |                         |                         |
| TTD                             | 2 (0.02 ± 0.01)        | 2 (0.02 ± 0.02)        | 107 (0.70 ± 0.07)        | 0                       | 58 (0.82 ± 0.11)        | 2 (0.02 ± 0.01)         |
| LTChr                           | 1 (0.01 ± 0.01)        | 1 (0.01 ± 0.01)        | 19 (0.13 ± 0.03)         | 2 (0.02 ± 0.02)         | 6 (0.08 ± 0.03)         | 5 (0.04 ± 0.02)         |
| LLAF                            | 0                      | 2 (0.02 ± 0.02)        | 18 (0.12 ± 0.03)         | 0                       | 12 (0.17 ± 0.05)        | 2 (0.02 ± 0.01)         |
| <b>Total</b>                    | <b>3 (0.03 ± 0.02)</b> | <b>5 (0.06 ± 0.03)</b> | <b>144 (0.95 ± 0.08)</b> | <b>2 (0.02 ± 0.02)</b>  | <b>76 (1.07 ± 0.12)</b> | <b>9 (0.07 ± 0.02)</b>  |
| <b>EXCHANGE ABERRATIONS</b>     |                        |                        |                          |                         |                         |                         |
| Simple translocations           |                        |                        |                          |                         |                         |                         |
| complete                        | 0                      | 0                      | 16 (0.11 ± 0.03)         | 17 (0.20 ± 0.05)        | 18 (0.25 ± 0.06)        | 11 (0.09 ± 0.03)        |
| incomplete                      | 0                      | 0                      | 14 (0.09 ± 0.02)         | 0                       | 6 (0.08 ± 0.03)         | 0                       |
| one-way                         | 0                      | 0                      | 20 (0.13 ± 0.03)         | 7 (0.08 ± 0.03)         | 10 (0.14 ± 0.04)        | 7 (0.06 ± 0.02)         |
| <b>Total</b>                    | <b>0</b>               | <b>0</b>               | <b>50 (0.33 ± 0.05)</b>  | <b>24 (0.29 ± 0.06)</b> | <b>34 (0.48 ± 0.08)</b> | <b>18 (0.15 ± 0.03)</b> |
| Simple dicentric                |                        |                        |                          |                         |                         |                         |
| complete                        | 0                      | 0                      | 8 (0.05 ± 0.02)          | 0                       | 16 (0.23 ± 0.06)        | 0                       |
| incomplete                      | 0                      | 0                      | 4 (0.03 ± 0.01)          | 0                       | 5 (0.07 ± 0.03)         | 0                       |
| one-way                         | 1 (0.01 ± 0.01)        | 2 (0.02 ± 0.02)        | 17 (0.11 ± 0.03)         | 2 (0.02 ± 0.02)         | 8 (0.11 ± 0.04)         | 0                       |
| <b>Total</b>                    | <b>1 (0.01 ± 0.01)</b> | <b>2 (0.02 ± 0.02)</b> | <b>29 (0.19 ± 0.04)</b>  | <b>2 (0.02 ± 0.02)</b>  | <b>29 (0.41 ± 0.08)</b> | <b>0</b>                |
| <b>Total simple</b>             | <b>1 (0.01 ± 0.01)</b> | <b>2 (0.02 ± 0.02)</b> | <b>79 (0.52 ± 0.06)</b>  | <b>26 (0.31 ± 0.06)</b> | <b>63 (0.89 ± 0.11)</b> | <b>18 (0.15 ± 0.03)</b> |
| <b>Complex aberrations</b>      | <b>0</b>               | <b>0</b>               | <b>36 (0.24 ± 0.04)</b>  | <b>2 (0.02 ± 0.02)</b>  | <b>31 (0.44 ± 0.08)</b> | <b>1 (0.01 ± 0.01)</b>  |

Notes. TTD: True terminal deletions, LTChr: Lone truncated chromosomes, LLAF: Lone linear acentric fragments. Frequencies and standard errors (SE) are shown in parentheses.

complex aberrations, the initial frequencies ± SE (×100) (17.08 ± 1.87 and 8.02 ± 1.28, respectively) reached values near zero at 216 h.

#### mFISH

Table 1 shows the results obtained by mFISH in the first (48 h after irradiation) and the last (end of the culture period) samples, where a total of 615 cells were analyzed. In the first sample, the frequencies per cell ± SE of non-exchange aberrations were significantly higher in the cultures irradiated with 2 and 4 Gy than in the control culture ( $P < 0.01$ , Student's  $t$  test). The most frequent non-exchange aberration in the irradiated cultures was TTD, representing about 75% of all non-exchange aberrations at both doses. In the last samples, the frequencies per cell ± SE of non-exchange aberrations were very similar to those from the control culture.

For simple exchange aberrations, the analysis by mFISH

allowed us to distinguish complete, true incomplete and one-way translocations. In the cultures irradiated with 2 and 4 Gy, simple dicentric showed a clear decline between the first and the last samples. For translocations, at 2 Gy, the frequency per cell ± SE of complete plus one-way simple translocations remained relatively constant between the first and last samples (0.24 ± 0.04 and 0.29 ± 0.06, respectively), while incomplete translocations disappeared. At 4 Gy, incomplete translocations also disappeared, and complete plus one-way simple translocations showed a 60% decline (from 0.39 ± 0.07 to 0.15 ± 0.03). Complex aberrations almost disappeared in the last sample. No clonal aberrations were observed in the last samples.

When the frequencies per cell ± SE of simple translocations in the first sample detected by mFISH were compared with the genomic frequencies (35) detected by painting (0.20 ± 0.04 and 0.54 ± 0.06 at 2 and 4 Gy), comparable results were obtained.

**TABLE 2**  
**Chromosome Aberrations Observed in Stable Cells by mFISH**

|                                        | 2 Gy first              | 2 Gy last               | 4 Gy first             | 4 Gy last               |
|----------------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| Stable cell                            | 71                      | 81                      | 23                     | 120                     |
| Stable cells with aberrations          | 15                      | 21                      | 6                      | 17                      |
| LTChr                                  | 7 (0.10 ± 0.04)         | 2 (0.02 ± 0.02)         | 2 (0.09 ± 0.06)        | 5 (0.04 ± 0.02)         |
| Complete translocation                 | 6 (0.08 ± 0.03)         | 17 (0.21 ± 0.05)        | 3 (0.13 ± 0.08)        | 11 (0.09 ± 0.03)        |
| One-way translocation                  | 5 (0.07 ± 0.03)         | 7 (0.09 ± 0.03)         | 2 (0.09 ± 0.06)        | 7 (0.06 ± 0.02)         |
| Transmissible complex aberrations      | 3 (0.04 ± 0.02)         | 2 (0.02 ± 0.02)         | 0                      | 1 (0.01 ± 0.01)         |
| <b>Total transmissible aberrations</b> | <b>21 (0.30 ± 0.06)</b> | <b>28 (0.35 ± 0.07)</b> | <b>7 (0.30 ± 0.12)</b> | <b>24 (0.20 ± 0.04)</b> |

Notes. LTChr: Lone truncated chromosomes. Frequencies and standard errors (SE) are shown in parentheses.



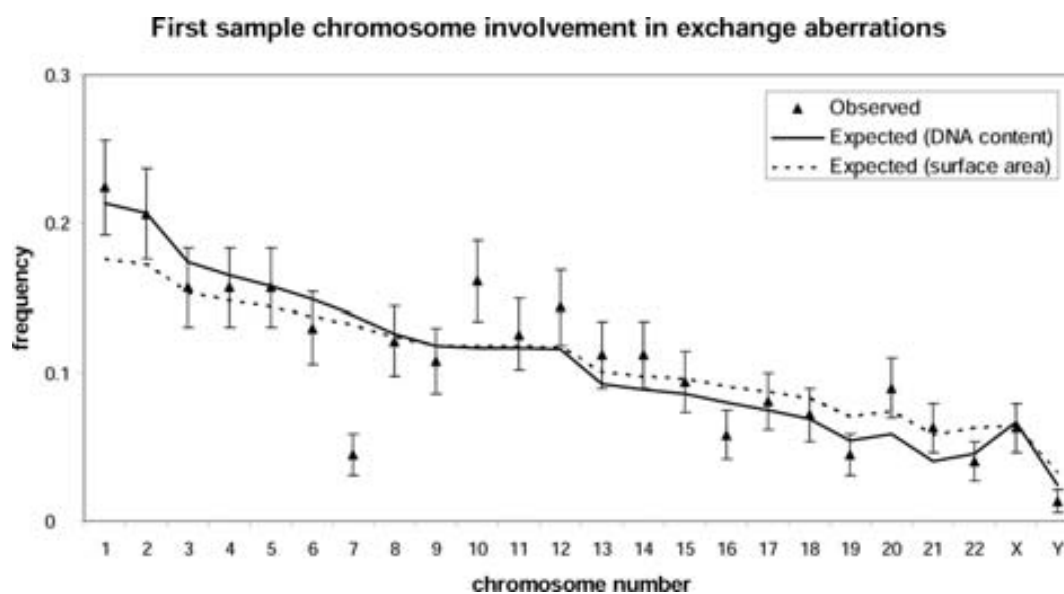
**TABLE 3**  
**Cycle Structure of Complex Aberrations Observed by mFISH**

| Number of breaks    | Cycle structure | 2 Gy cycles |                       | 4 Gy cycles |                       |
|---------------------|-----------------|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|
|                     |                 | Number      | Accumulated frequency | Number      | Accumulated frequency |
| First samples       |                 |             |                       |             |                       |
| 3                   | c3              | 17          | 0.47                  | 13          | 0.42                  |
| 4                   | c4              | 1           |                       | 4           |                       |
|                     | c2+c2           | 6           | 0.67                  | 3           | 0.65                  |
| 5                   | c5              |             |                       | 1           |                       |
|                     | c3+c2           | 6           | 0.83                  | 2           | 0.74                  |
| 6                   | c6              | 1           |                       |             |                       |
|                     | c4+c2           | 2           | 0.92                  | 2           | 0.81                  |
| 7                   | c5+c2           | 1           |                       |             |                       |
|                     | c3+c2+c2        |             | 0.94                  | 1           | 0.84                  |
| 8                   | c8              |             |                       | 1           |                       |
|                     | c4+c4           |             |                       | 1           | 0.90                  |
| 9                   | c6+c3           |             |                       | 2           |                       |
|                     | c4+c3+c2        | 1           | 0.97                  |             | 0.97                  |
| 13                  | c9+c2+c2        |             |                       | 1           |                       |
|                     | c5+c5+c3        | 1           | 1.00                  |             | 1.00                  |
| <b>Total cycles</b> |                 | <b>36</b>   |                       | <b>31</b>   |                       |
| Last samples        |                 |             |                       |             |                       |
| 3                   | c3              | 1           | 0.50                  | 1           | 1.00                  |
| 4                   | c2+c2           | 1           | 1.00                  |             |                       |
| <b>Total cycles</b> |                 | <b>2</b>    |                       | <b>1</b>    |                       |

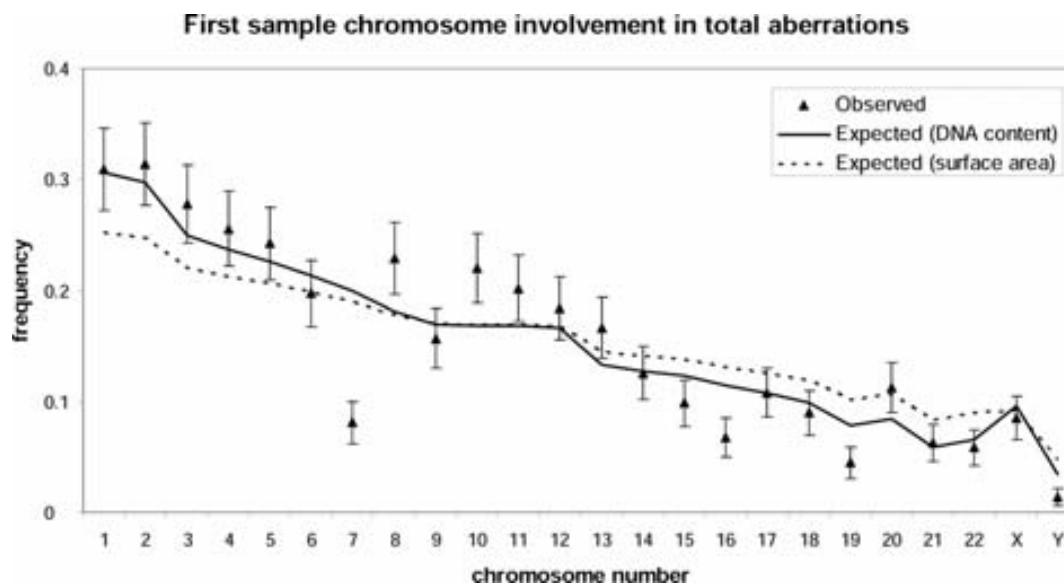
Table 2 shows the aberrations observed in stable cells, those without dicentrics, acentric fragments and rings. In the first samples, 48 h after irradiation, the percentages of stable cells were 47 and 32% at 2 and 4 Gy, respectively, increasing to 97% for both doses in the last samples. Complete plus one-way translocations were the most frequent transmissible aberrations observed in stable cells. The frequencies per cell  $\pm$  SE of total transmissible aberrations

between the first and last samples were not significantly different.

The frequencies per cell  $\pm$  SE of complex aberrations in the first sample (Table 1) were clearly higher than those observed by painting ( $0.02 \pm 0.01$  and  $0.08 \pm 0.01$  at 2 and 4 Gy). Moreover, the proportion of complex aberrations respect to total exchange ones, at 2 and 4 Gy, were 31 and 33% respectively, significantly higher than those detected



**FIG. 5.** Observed and expected frequencies of chromosome involvement in exchange aberrations of the first sample (2 plus 4 Gy 48 h after irradiation). Expected frequencies have been calculated taking into account the DNA content (solid line) (36) and the surface area (dotted line) (37) models. Bars indicate standard errors.

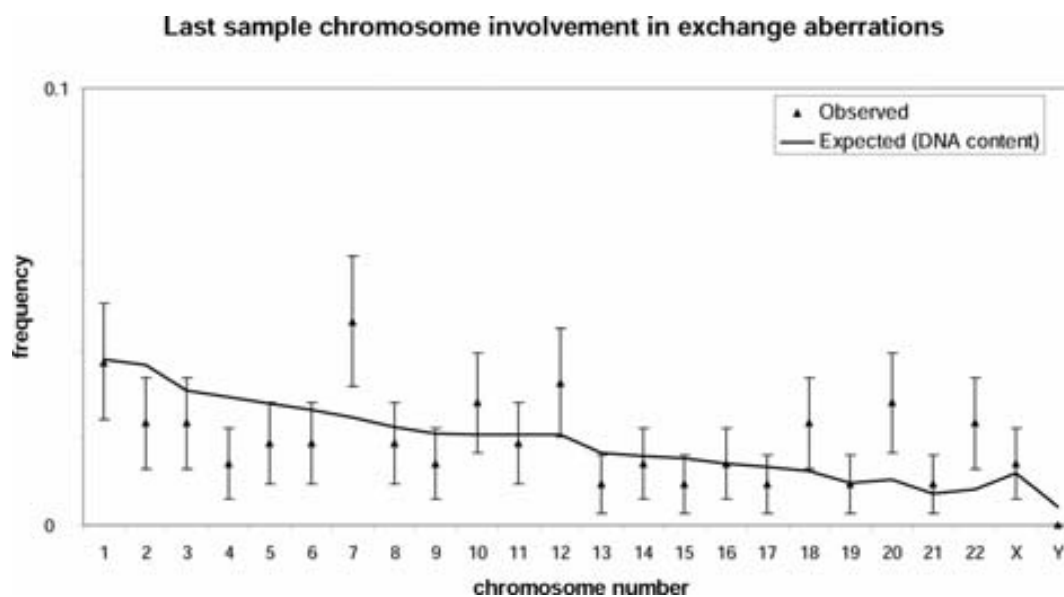


**FIG. 6.** Observed and expected frequencies of chromosome involvement in total aberrations of the first sample (2 plus 4 Gy 48 h after irradiation). Expected frequencies have been calculated taking into account the DNA content (solid line) (36) and the surface area (dotted line) (37) models. Bars indicate standard errors.

by painting (11%,  $P < 0.01$ , and 19%,  $P < 0.02$ , at 2 and 4 Gy, respectively; difference between proportions test). Table 3 gives a detailed description of the complex aberrations observed by mFISH. At 2 and 4 Gy, the simplest complex exchanges (C/A/3) accounted for around 45% of all cycle structures. To achieve 90% of the accumulated frequency of total cycle structures, six and eight breaks are needed at 2 and 4 Gy, respectively. Similarly, at 2 Gy, the largest cycle observed was a c6 while at 4 Gy it was a c9. In the 4-Gy first samples, no cell showed transmissible complex aberrations. In the 2-Gy first samples, three cells showed transmissible complex aberrations, none of them being an

insertion (CAB 3/3/3; 3/3/3; and 4/4/5). In the last samples, all complex aberrations were transmissible, at 4 Gy it was one insertion (CAB 2/2/3), and at 2 Gy (CAB 3/3/3 and 3/4/4) none was an insertion. The largest cycle structure in these transmissible complex aberrations was a c3.

On the other hand, mFISH technique allows us to identify which chromosomes are involved in chromosome aberrations. Combining the 825 breaks observed in the first samples at 2 and 4 Gy, the involvement of each chromosome in exchange and in total aberrations was checked using two models, the DNA content (36) and the surface area of chromosome territories (37). For the involvement of



**FIG. 7.** Observed (solid triangles) and expected (solid line) frequencies of chromosome involvement in exchange aberrations of the last samples (2 plus 4 Gy). Expected frequencies have been calculated taking the DNA content into account (36). Bars indicate standard errors.

each chromosome in exchange aberrations, 391 color junctions were observed (Fig. 5), and no significant deviations from the random hypothesis were observed for either model ( $\chi^2 = 32.75$ ,  $P = 0.08$ , DNA content model;  $\chi^2 = 34.07$ ,  $P = 0.06$ , surface area model). Chromosome 7 showed the highest deviation, being less involved than expected. For the number of breaks of total aberrations (Fig. 6), significant deviations from random involvement were observed for both models ( $\chi^2 = 42.16$ ,  $P < 0.01$ , DNA content model;  $\chi^2 = 64.85$ ,  $P < 0.001$ , surface area model). The chromosomes with significant deviations from the expected values were 7 and 16 with the DNA content model and 7, 16, 19 and Y with the surface area model and in all cases less involved than expected. When the 75 color junctions from the last samples at 2 and 4 Gy were considered (Fig. 7), with the DNA content model no deviation from the random involvement in exchange aberrations was observed ( $\chi^2 = 28.56$ ,  $P = 0.19$ ), with chromosomes 7, 20 and 22 being more involved than expected.

To analyze the proximity effect in the interphase nuclei and its influence on the formation of exchange aberrations, the web-based application SCHIP (Statistics for CHromosome Interface Positioning) based on interchange data was applied (38). In this application, significant deviations from the null hypothesis of random chromosome-chromosome spatial associations are assessed by Monte Carlo computer simulations. To combine data from 2 and 4 Gy, the deviations from randomness obtained by SCHIP were tested by the Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test ( $P = 0.64$  and  $P = 0.38$  in the first and last samples, respectively). The results indicate that the two data sets are samples from the same underlying ordered distribution, allowing us to merge both data sets. Tables 4 and 5 show the number of exchanges between chromosomes and the deviations from the null hypothesis calculated by SCHIP for the first and last samples, respectively. In the first samples, 12 clusters of two chromosomes showed deviations from the null hypothesis higher than 2. From these, 10 showed  $P$  values calculated by SCHIP lower than 0.05 (Table 6). After false discovery rate (FDR) correction, due to multiple testing, clusters 13-20, 21-22, 15-17 and 11-20 maintained significance. From the 10 SCHIP significant two-chromosome clusters, when the same chromosome was involved in more than one cluster, we tested whether a higher-order cluster existed. Clusters 1-4-5, 11-13-20 and 1-4-5-14 showed significance. In the last cultures, 16 clusters of two chromosomes showed deviations greater than 2.5 from the null hypothesis (Table 5). From these, nine showed  $P$  values calculated by SCHIP lower than 0.05 (Table 6), but after FDR correction only clusters 5-20 and 9-10 maintained significance. In addition, clusters 1-17-19, 2-4-6, 5-14-20 and 9-10-21 showed significance.

## DISCUSSION

The follow-up of radiation-induced chromosome aberration frequencies was carried out during 3 weeks after ir-

radiation. By painting, in cells irradiated with 2 Gy, the frequency of AST did not vary with time postirradiation. However, in cells irradiated with 4 Gy, the frequency of AST showed an initial abrupt decline followed by a slight decrease. A higher decrease with time postirradiation in the frequency of translocations as the dose increased has been described after irradiation of mice (39–41) and after irradiation of rat peripheral blood culture (42). In cases of accidental exposures of humans, the frequency of translocations persists with time for doses below 1–3 Gy (8, 43), but a decrease is observed after higher doses (15). In radiotherapy-treated cancer patients, the higher the initial frequency of translocations, the higher the decrease with time postirradiation (9, 44). Overall, the results indicate that at high doses the initial yield of translocations is not maintained with time postirradiation. Thus, for dose reconstruction, the higher the initial dose of exposure, the lower the ability to estimate the initial dose accurately.

Compared to the study of Loucas and Cornforth (24), the frequencies of non-exchange aberrations detected by mFISH in the present study were clearly higher; no explanation for this discrepancy can be obtained from the present results.

Completeness and complexity are factors that can influence the disappearance of translocations with time postirradiation. The analysis of translocations by mFISH allows the distinguishing of complete (two-way), one-way and true incomplete translocations. In the present study, after 2 Gy irradiation, the frequency of complete plus one-way translocations remained relatively constant until the end of the culture, whereas at 4 Gy a reduction to one-third of the initial values was observed. However, true incomplete translocations disappeared in the last sample of both the 2- and 4-Gy irradiated cultures. FISH painting studies have shown that two-way translocations are more persistent with time postirradiation than one-way translocations (5, 15, 18, 19, 40, 41, 45), but the last category includes one-way and true incomplete translocations. When one-way and true incomplete translocations were analyzed by mFISH, our results indicated that the last ones disappear preferentially with time postirradiation (Table 1). The results presented here show that after exposures to 4 Gy of ionizing radiation, the reduction with time of the frequency of simple translocations cannot be explained only by the disappearance of true incomplete translocations, because one-way plus complete translocation frequencies also decrease. When only stable cells were considered, the frequency of transmissible aberrations did not vary between the first and last sample, although the low number of stable cells in the first 4-Gy sample makes it difficult to reach clear conclusions.

It has been reported that the frequencies of radiation-induced translocations and dicentrics are similar, and that cells containing a simple complete dicentric, but no other aberrations, will divide into two surviving daughter cells with a 42% probability (49–51). After irradiation with 3 Gy of X rays, the majority of apoptotic peripheral blood lym-

**TABLE 4**  
**Chromosome Pairwise Yields from Radiation-Induced Aberrations of the First Samples (upper left) and**  
**SCHIP Estimated Deviations from Expected (lower right)**

| Chr <sup>a</sup> | 1  | 2    | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    |
|------------------|----|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 22               | 1  | 0    | 1     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     |
| 21               | 1  | 1    | 3     | 1     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 3     | 0     |
| 20               | 0  | 2    | 0     | 4     | 2     | 0     | 1     | 0     | 0     | 1     | 8     |
| 19               | 2  | 3    | 1     | 2     | 1     | 0     | 0     | 1     | 1     | 2     | 0     |
| 18               | 2  | 2    | 0     | 0     | 1     | 2     | 1     | 1     | 2     | 1     | 1     |
| 17               | 3  | 2    | 2     | 2     | 0     | 1     | 0     | 1     | 2     | 1     | 1     |
| 16               | 0  | 1    | 4     | 0     | 0     | 2     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     |
| 15               | 3  | 6    | 1     | 1     | 2     | 0     | 0     | 1     | 1     | 1     | 2     |
| 14               | 8  | 3    | 1     | 3     | 0     | 0     | 2     | 1     | 3     | 1     | 0     |
| 13               | 5  | 1    | 0     | 0     | 0     | 3     | 0     | 1     | 1     | 4     | 1     |
| 12               | 1  | 0    | 6     | 4     | 0     | 3     | 0     | 6     | 1     | 3     | 5     |
| 11               | 1  | 6    | 1     | 1     | 3     | 3     | 1     | 2     | 3     | 0     |       |
| 10               | 5  | 3    | 4     | 3     | 3     | 1     | 3     | 2     | 2     |       | -1.52 |
| 9                | 4  | 3    | 4     | 2     | 2     | 4     | 0     | 2     |       | -0.09 | 0.73  |
| 8                | 4  | 3    | 1     | 2     | 5     | 3     | 0     |       | 0.13  | -0.09 | 0.02  |
| 7                | 2  | 0    | 0     | 0     | 1     | 1     |       | -0.76 | -0.76 | 2.85  | 0.48  |
| 6                | 4  | 3    | 3     | 3     | 2     |       | 0.54  | 0.82  | 1.56  | -0.81 | 0.68  |
| 5                | 11 | 2    | 7     | 8     |       | -0.42 | 0.20  | 1.48  | -0.38 | -0.04 | 0.10  |
| 4                | 3  | 8    | 1     |       | 2.46  | 0.34  | -0.87 | -0.26 | -0.26 | 0.11  | -0.99 |
| 3                | 6  | 4    |       | -1.27 | 1.79  | 0.26  | -0.89 | -0.95 | 0.94  | 0.62  | -1.04 |
| 2                | 10 |      | -0.21 | 1.82  | -1.22 | -0.17 | -1.00 | -0.12 | -0.12 | -0.40 | 1.34  |
| 1                |    | 1.13 | 0.23  | -0.97 | 2.22  | -0.04 | 0.68  | 0.02  | 0.02  | 0.16  | -1.59 |

Note. 2 Gy and 4 Gy are merged.

<sup>a</sup> Chr = chromosome number.

**TABLE 5**  
**Chromosome Pairwise Yields from Radiation-Induced Aberrations of the First Samples (upper left) and**  
**SCHIP Estimated Deviations from Expected (lower right)**

| Chr <sup>a</sup> | 1 | 2    | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    |
|------------------|---|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 22               | 0 | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     |
| 21               | 0 | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 2     | 0     | 0     | 2     | 0     |
| 20               | 0 | 0    | 2     | 2     | 4     | 0     | 2     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 19               | 2 | 0    | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 18               | 2 | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 3     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 17               | 2 | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 16               | 0 | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 2     | 0     | 0     | 0     | 1     |
| 15               | 0 | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 2     | 0     | 0     | 0     |
| 14               | 0 | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 13               | 0 | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 2     | 0     | 0     | 1     | 0     |
| 12               | 1 | 0    | 2     | 0     | 0     | 1     | 4     | 1     | 0     | 0     | 2     |
| 11               | 0 | 2    | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |       |
| 10               | 2 | 0    | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 4     |       | -0.65 |
| 9                | 0 | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |       | 6.21  | -0.45 |
| 8                | 2 | 0    | 0     | 0     | 2     | 0     | 0     |       | -0.49 | -0.70 | -0.53 |
| 7                | 0 | 2    | 0     | 1     | 0     | 0     |       | -0.97 | -0.82 | -1.17 | -0.90 |
| 6                | 1 | 2    | 0     | 0     | 0     |       | -0.82 | -0.49 | -0.41 | 1.11  | -0.45 |
| 5                | 0 | 0    | 2     | 0     |       | -0.52 | -1.04 | 2.59  | -0.52 | -0.75 | -0.57 |
| 4                | 0 | 2    | 0     |       | -0.52 | -0.41 | 0.41  | -0.49 | -0.41 | -0.59 | -0.45 |
| 3                | 0 | 0    |       | -0.52 | 2.33  | -0.52 | -1.04 | -0.62 | -0.52 | -0.75 | 1.17  |
| 2                | 1 |      | -0.71 | 3.04  | -0.71 | 3.04  | 0.69  | -0.66 | -0.56 | -0.80 | 2.66  |
| 1                |   | 0.16 | -0.87 | -0.68 | -0.87 | 0.80  | -1.36 | 1.66  | -0.68 | 1.07  | -0.75 |

Note. 2 Gy and 4 Gy are merged.

<sup>a</sup> Chr = Chromosome number.

## PERSISTENCE OF RADIATION-INDUCED CHROMOSOME ABERRATIONS

433

**TABLE 4**  
**Extended**

| 12    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    | 20    | 21    | 22    |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2     | 1     | 2     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 2     |       |
| 1     | 1     | 1     | 0     | 1     | 1     | 0     | 0     | 0     |       | 3.27  |
| 0     | 4     | 0     | 2     | 0     | 0     | 2     | 0     |       | -0.77 | 0.83  |
| 0     | 1     | 0     | 1     | 0     | 0     | 1     |       | -0.74 | -0.59 | -0.51 |
| 0     | 1     | 1     | 1     | 0     | 1     |       | 0.94  | 1.57  | -0.66 | -0.57 |
| 0     | 2     | 1     | 6     | 2     |       | 0.33  | -0.76 | -0.99 | 0.50  | -0.68 |
| 0     | 2     | 1     | 2     |       | 1.89  | -0.64 | -0.57 | -0.74 | 1.12  | -0.51 |
| 2     | 2     | 2     |       | 1.41  | 3.98  | 0.04  | 0.27  | 0.60  | -0.90 | 0.48  |
| 5     | 2     |       | 0.13  | 0.27  | -0.31 | 0.04  | -0.87 | -1.14 | 0.21  | 1.75  |
| 2     |       | 0.26  | 0.26  | 1.55  | 0.68  | 0.13  | 0.36  | 2.56  | 0.30  | 0.58  |
|       | 0.11  | 2.09  | -0.02 | -0.92 | -1.23 | -1.04 | -0.92 | -1.21 | 0.10  | 1.58  |
| 1.89  | -0.60 | -1.41 | 0.02  | -0.91 | -0.39 | -0.04 | -0.91 | 5.52  | -0.94 | 0.40  |
| 0.40  | 1.47  | -0.78 | -0.78 | -0.95 | -0.47 | -0.12 | 1.16  | -0.43 | 2.09  | -0.85 |
| -0.72 | -0.52 | 0.87  | -0.61 | -0.87 | 0.55  | 1.06  | 0.27  | -1.14 | -0.90 | -0.79 |
| 2.79  | -0.52 | -0.61 | -0.61 | 0.27  | -0.31 | 0.04  | 0.27  | -1.14 | -0.90 | -0.79 |
| -0.80 | -0.72 | 1.89  | -0.76 | -0.49 | -0.65 | 1.27  | -0.49 | 0.92  | -0.51 | -0.44 |
| 0.63  | 0.98  | -1.37 | -1.37 | 1.37  | -0.34 | 1.02  | -0.89 | -1.16 | -0.92 | -0.80 |
| -1.71 | -1.55 | -1.62 | -0.38 | -1.05 | -1.40 | -0.32 | -0.09 | 0.09  | -0.16 | 0.12  |
| 0.81  | -1.48 | 0.39  | -0.90 | -1.00 | 0.15  | -1.13 | 0.99  | 1.73  | -0.07 | -0.90 |
| 1.92  | -1.51 | -0.95 | -0.95 | 2.87  | 0.09  | -1.15 | -0.05 | -1.34 | 1.78  | 0.16  |
| -1.89 | -1.13 | -0.12 | 1.55  | -0.30 | -0.26 | 0.23  | 1.42  | -0.21 | -0.37 | -1.05 |
| -1.63 | 0.72  | 2.03  | -0.48 | -1.29 | 0.02  | -0.07 | 0.26  | -1.69 | -0.58 | -0.30 |

**TABLE 5**  
**Extended**

| 12    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    | 20    | 21    | 22    |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     |       |
| 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |       | -0.28 |
| 0     | 0     | 2     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |       | -0.58 | -0.50 |
| 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |       | -0.50 | -0.28 | -0.24 |
| 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |       | -0.35 | -0.71 | -0.40 | 2.55  |
| 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |       | -0.28 | -0.20 | -0.41 | -0.23 | -0.20 |
| 0     | 0     | 1     | 0     |       | -0.23 | -0.40 | -0.28 | -0.58 | -0.32 | -0.28 |
| 1     | 0     | 0     |       | -0.28 | -0.20 | -0.35 | -0.24 | -0.50 | -0.28 | -0.24 |
| 0     | 0     |       | -0.28 | 2.76  | -0.23 | -0.40 | -0.28 | 2.88  | -0.32 | 3.29  |
| 0     |       | -0.28 | -0.24 | -0.28 | -0.20 | -0.35 | -0.24 | -0.50 | -0.28 | -0.24 |
|       | -0.50 | -0.58 | 1.50  | -0.58 | -0.41 | -0.71 | -0.50 | -1.03 | -0.58 | -0.50 |
| 2.09  | -0.35 | -0.40 | -0.35 | 2.10  | -0.28 | -0.49 | -0.35 | -0.71 | -0.40 | -0.35 |
| -0.94 | 1.76  | -0.52 | -0.45 | -0.52 | -0.37 | -0.65 | -0.45 | -0.94 | 3.29  | -0.45 |
| -0.65 | -0.31 | -0.36 | -0.31 | -0.36 | -0.26 | -0.45 | -0.31 | -0.65 | -0.36 | 2.87  |
| 0.52  | -0.37 | -0.43 | 4.97  | -0.43 | -0.30 | -0.53 | -0.37 | -0.77 | -0.43 | -0.37 |
| 1.79  | 2.56  | -0.73 | -0.63 | 2.02  | -0.51 | 2.45  | -0.63 | 0.25  | 2.02  | -0.63 |
| 0.89  | -0.31 | -0.36 | -0.31 | -0.36 | -0.26 | -0.45 | -0.31 | -0.65 | -0.36 | -0.31 |
| -0.83 | -0.40 | -0.47 | -0.40 | -0.47 | -0.33 | -0.57 | -0.40 | 3.99  | -0.47 | -0.40 |
| -0.65 | -0.31 | -0.36 | -0.31 | -0.36 | -0.26 | -0.45 | -0.31 | 2.43  | -0.36 | -0.31 |
| 1.58  | -0.40 | -0.47 | -0.40 | -0.47 | -0.33 | -0.57 | 2.09  | 1.58  | -0.47 | -0.40 |
| -0.88 | -0.43 | -0.50 | -0.43 | -0.50 | -0.35 | -0.61 | -0.43 | -0.88 | -0.50 | -0.43 |
| -0.15 | -0.52 | -0.60 | -0.52 | -0.60 | 4.28  | 1.94  | 3.31  | -1.08 | -0.60 | -0.52 |

**TABLE 6**  
**Chromosome Clusters and Their Significance**

| First samples      |                |                                        | Last samples       |                |                           |
|--------------------|----------------|----------------------------------------|--------------------|----------------|---------------------------|
| Chromosome cluster | SCHIP <i>P</i> | FDR <sup>a</sup><br>corrected <i>P</i> | Chromosome cluster | SCHIP <i>P</i> | FDR<br>corrected <i>P</i> |
| Two chromosomes    |                |                                        | Two chromosomes    |                |                           |
| 10;21              | 0.072          | 0.072                                  | 18;22              | 0.114          | 0.114                     |
| 12;14              | 0.055          | 0.060                                  | 14;16              | 0.099          | 0.105                     |
| 1;14               | 0.049          | 0.058                                  | 9;22               | 0.096          | 0.109                     |
| 13;20              | 0.035          | 0.047                                  | 14;22              | 0.076          | 0.094                     |
| 21;22              | 0.033          | 0.049                                  | 5;8                | 0.061          | 0.081                     |
| 7;10               | 0.031          | 0.054                                  | 7;13               | 0.059          | 0.085                     |
| 1;5                | 0.026          | 0.053                                  | 2;11               | 0.058          | 0.092                     |
| 4;5                | 0.025          | 0.060                                  | 14;20              | 0.041          | 0.073                     |
| 3;16               | 0.023          | 0.068                                  | 2;6                | 0.041          | 0.081                     |
| 8;12               | 0.019          | 0.075                                  | 2;4                | 0.037          | 0.084                     |
| 15;17              | 0.003          | 0.016                                  | 1;19               | 0.033          | 0.087                     |
| 11;20              | 0.0002         | 0.002                                  | 10;21              | 0.033          | 0.105                     |
|                    |                |                                        | 1;17               | 0.014          | 0.056                     |
|                    |                |                                        | 8;15               | 0.010          | 0.055                     |
|                    |                |                                        | 5;20               | 0.005          | 0.042                     |
|                    |                |                                        | 9;10               | 0.0003         | 0.005                     |
| Three chromosomes  |                |                                        | Three chromosomes  |                |                           |
| 1;4;5              | 0.020          | 0.020                                  | 1;17;19            | 0.041          | 0.041                     |
| 11;13;20           | 0.0003         | 0.001                                  | 2;4;6              | 0.005          | 0.006                     |
|                    |                |                                        | 5;14;20            | 0.003          | 0.005                     |
|                    |                |                                        | 9;10;21            | 0.001          | 0.003                     |
| Four chromosomes   |                |                                        |                    |                |                           |
| 1;4;5;14           | 0.040          | 0.040                                  |                    |                |                           |

<sup>a</sup> False discovery rate.

phocytes contained dicentric chromosomes (52). In the present study, at 2 Gy the initial frequency of dicentrics should be the same as that observed for translocations (0.33). Considering the theoretical dicentrics transmission described above, after 48 h, 1.3 cell population doublings occurred, and the expected frequency of dicentrics should be 0.12, slightly lower than what was observed (0.19). At 4 Gy and using the same approach, the observed and expected frequencies of dicentrics at 48 h after irradiation (0.5 cell population doublings) were 0.41 and 0.38, respectively. In the first days after irradiation, more cell population doublings occurred at 2 Gy than at 4 Gy. This could explain why the frequencies of simple dicentrics and simple translocations were more similar at 4 Gy than at 2 Gy, where more population doublings occurred and more cells with dicentrics were eliminated.

A good agreement for simple aberrations was observed between the frequencies obtained with mFISH and painting, but with mFISH the frequencies of complex aberrations were higher than by painting. As described previously (28, 46), a greater efficiency of multicolor techniques in detecting complex aberrations was observed, indicating that some complex aberrations are not detected or are misclassified as simple ones when monocolor FISH painting is used. In the first samples of the present study, the greater frequency of complex aberrations and the largest cycle structures were

observed at 4 Gy. This is in agreement with previous results, where an increase in the frequency of complex exchanges as a power function of the dose relative to the number of breaks involved was reported (24). On the other hand, it has been suggested that insertions could be used as biomarkers of past exposures to high-LET radiation (47). Insertions were the most frequent complex aberrations detected in individuals exposed occupationally to internal plutonium, although other transmissible and non-transmissible complex aberrations were also observed (27). Our results indicate that after high doses of low-LET radiation, insertions can also be observed with time after the exposure. The decrease with time postirradiation in the complexity of the remaining aberrations (lower CAB and lower cycle structure) is in agreement with a decrease in the mean CAB of complex aberrations in long-term cultures after exposure to  $\alpha$  particles (48). The low number of stable complex aberrations remaining at the end of the cultures is in agreement with the lower efficiency described for low-LET radiation for inducing stable complex chromosome aberrations (29, 48).

With respect to the decrease in complete plus one-way simple translocations at 4 Gy with time, no influence of complex aberrations can be concluded, because at 2 Gy complex aberrations disappeared, but the frequencies of complete plus one-way translocations did not vary between

the first and last sample. Our results indicate a dose influence in the decrease of translocations with time postirradiation, and this decrease cannot be fully explained by the disappearance of true incomplete translocations and complex aberrations. With FISH painting and Monte Carlo simulations, it has been shown that translocation frequencies can decline as a by-product of selection against dicentrics or by their inherent lethality, with one-way translocations appearing to be lethal more often than two-way translocations (19). One-way translocations identified by painting can be split into two categories by mFISH, one-way and true incomplete translocations. From our results, true incomplete translocations are clear candidates for having a higher inherent lethality. In addition to the clear selection against mitotic unstable aberrations, for mitotic stable aberrations, like translocations, incompleteness should be considered as an important factor contributing to their decline with time after exposure.

When the chromosome involvement in radiation-induced chromosome aberrations is considered, painting studies have shown no clear evidence of a non-random involvement in exchange aberrations, although punctual deviations were observed (37, 53–54). It has been suggested that a better agreement between the observed and expected involvement in exchange aberrations is obtained when the surface area of the chromosomal territories is considered instead DNA content (37). For distances of interaction as large as 1  $\mu\text{m}$ , a good agreement with the surface area has been obtained (55). mFISH techniques allows us to study simultaneously the involvement of each chromosome in radiation-induced aberrations. With mFISH, the involvement of each chromosome in exchange aberrations have shown a better fit with the surface area model than with the DNA content model (30, 56). However, when all types of radiation-induced aberrations were considered, a better fit was obtained when considering the DNA content instead of the surface area (57). In our study, no deviations from random involvement in exchange aberrations were observed for the DNA content and surface area models. However, when total breaks were considered, a significant deviation from random involvement was observed with both models, but a better agreement between the observed and expected values was obtained with the DNA content model.

When the long-term effects of ionizing radiation are assessed, a selection of advantageous aberrations cannot be discounted. In this sense, it was surprising that chromosome 7, which was less involved in chromosome aberrations in the first sample, was the most involved in the last sample. Deletion of part of chromosome 7 has been described as a consistent aberration in human acute leukemias and myelodysplasias from patients with a history of genotoxic exposure (58), including radiotherapy (59). Clonal abnormalities involving chromosome 7 have been observed in a high percentage of therapy-related myelodysplasia (t-MDS) and acute myeloid leukemia (t-AML) (60). In A-bomb survivors, about 50% of AMLs exhibit chromosome abnormal-

ities of chromosomes 5 and 7, in contrast to the 15% of AML patients without previous history of exposure, indicating that A-bomb survivor AMLs are more similar to therapy-related leukemias than to *de novo* AML/MDS (61). On the other hand, the Jurkat cell line used in the present study is derived from a human T-cell lymphoblastic leukemia, a malignancy showing a normal karyotype in at least 50% of cases. However, within the cytogenetic changes described in this malignancy, a high frequency of translocations involved the TCRB gene, which is located in 7q (62). The concordance of our results with the studies cited above indicate that more long-term studies are needed to establish definite conclusions.

Although it has been suggested that chromosomes occupy preferential relative positions within a cell nucleus (63), these positions are not fixed and are not strictly maintained in all cells of a population (30, 64). This variability can also be due to tissue-specific spatial organization of chromosomes, suggesting a role in the formation of recurrent chromosome arrangements among tissues (65). From the significant chromosome-chromosome associations observed in the present study, the translocation between chromosomes 15 and 17 was described in therapy-related acute myeloid leukemia (66, 67). In these chromosomes are located the PML and RAR genes, which are closely associated with hematopoietic precursor interphase nuclei, indicating a physical proximity of chromosomes 15 and 17 (68). The chromosomes of the cluster 1-17-19 coincide with those of the cluster 1-16-17-19-22 reported from radiogenic chromosome aberrations (31, 69). The present results on chromosome-chromosome associations were merged with those from Arsuaga *et al.* (31) (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test did not show differences between the two data sets,  $P = 0.83$ ). After FDR correction, five clusters of two chromosomes showed significance, 13-14 ( $P = 0.002$ ), 16-20, 6-12, 11-12 and 6-19, the last four with  $P$  values from 0.043 to 0.049. It is interesting to note that Robertsonian translocations 13/14 are the most common rearrangements in humans (70). More studies are needed to obtain conclusions on preferential interactions and on the spatial organization of interphase nuclei in different cell types.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work received financial support from the Spanish Consejo de Seguridad Nuclear (CSN-E 978-04). The investigators are part of SGR (2005, SGR 00164), RTICC (RD06/0020D/1020). JFB has a grant of the UAB (EME 2007-09).

Received: June 17, 2008; accepted: November 10, 2008

#### REFERENCES

1. IAEA, *Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment, a Manual*. Technical Reports Series no. 405, International Atomic Energy Agency, Vienna, 2005.
2. A. A. Awa, T. Sofuni, T. Honda, M. Itoh, S. Neriishi and M. Otake,

- Relationship between the radiation dose and chromosome aberrations in atomic bomb survivors of Hiroshima and Nagasaki. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **19**, 126–140 (1978).
3. K. E. Buckton, G. E. Hamilton, L. Paton and A. O. Langlois, Chromosome aberrations in irradiated ankylosing spondylitis patients. In *Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man* (H. J. Evans and D. C. Lloyd, Eds.), pp. 142–150. London University Press, London, 1978.
  4. M. Bauchinger, E. Schmid, H. Braselmann, N. Willich and C. Clemm, Time-effect relationship of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes after radiation therapy for seminoma. *Mutat. Res.* **211**, 265–272 (1989).
  5. C. Lindholm, M. Tekkel, T. Veidebaum, T. Ilus and S. Salomaa, Persistence of translocations after accidental exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 565–571 (1998).
  6. A. A. Edwards, C. Lindholm, F. Darroudi, G. Stephan, H. Romm, J. Barquinero, L. Barrios, M. R. Caballin, L. Roy and P. Voisin, Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications. *Radiat. Prot. Dosimetry* **113**, 396–402 (2005).
  7. M. L. Camparoto, A. T. Ramalho, A. T. Natarajan, M. P. Curado and E. T. Sakamoto-Hojo, Translocation analysis by the FISH-painting method for retrospective dose reconstruction in individuals exposed to ionizing radiation 10 years after exposure. *Mutat. Res.* **530**, 1–7 (2003).
  8. A. V. Sevan'kaev, D. C. Lloyd, A. A. Edwards, I. K. Khvostunov, G. F. Mikhailova, E. V. Golub, N. N. Shepel, N. M. Nadejina, I. A. Galstian and J. F. Barquinero, A cytogenetic follow-up of some highly irradiated victims of the Chernobyl accident. *Radiat. Prot. Dosimetry* **113**, 152–161 (2005).
  9. M. Xuncla, J. F. Barquinero, M. R. Caballin, J. Craven-Bartle, M. Ribas, J. M. de Vega and L. Barrios, Cytogenetic damage induced by radiotherapy. Evaluation of protection by amifostine and analysis of chromosome aberrations persistence. *Int. J. Radiat. Biol.* **84**, 243–251 (2008).
  10. K. Matsumoto, M. J. Ramsey, D. O. Nelson and J. D. Tucker, Persistence of radiation-induced translocations in human peripheral blood determined by chromosome painting. *Radiat. Res.* **149**, 602–613 (1998).
  11. E. J. Tawn and C. A. Whitehouse, Persistence of translocation frequencies in blood lymphocytes following radiotherapy: Implications for retrospective radiation biodosimetry. *J. Radiol. Prot.* **23**, 423–430 (2003).
  12. P. Rodriguez, A. Montoro, J. F. Barquinero, M. R. Caballin, I. Villaescusa and L. Barrios, Analysis of translocations in stable cells and their implications in retrospective biological dosimetry. *Radiat. Res.* **162**, 31–38 (2004).
  13. Y. C. Guerrero-Carbajal, J. E. Moquet, A. A. Edwards and D. C. Lloyd, The persistence of FISH translocations for retrospective biological dosimetry after simulated whole or partial body irradiation. *Radiat. Prot. Dosimetry* **76**, 159–168 (1998).
  14. M. Bauchinger, E. Schmid and H. Braselmann, Time-course of translocation and dicentric frequencies in a radiation accident case. *Int. J. Radiat. Biol.* **77**, 553–557 (2001).
  15. C. Lindholm, H. Romm, G. Stephan, E. Schmid, J. Moquet and A. Edwards, Intercomparison of translocation and dicentric frequencies between laboratories in a follow-up of the radiological accident in Estonia. *Int. J. Radiat. Biol.* **78**, 883–890 (2002).
  16. A. Duran, J. F. Barquinero, M. R. Caballin, M. Ribas, P. Puig, J. Egozcue and L. Barrios, Suitability of FISH painting techniques for the detection of partial-body irradiations for biological dosimetry. *Radiat. Res.* **157**, 461–468 (2002).
  17. J. R. Savage and P. Simpson, On the scoring of FISH-“painted” chromosome-type exchange aberrations. *Mutat. Res.* **307**, 345–353 (1994).
  18. F. S. Pala, J. E. Moquet, A. A. Edwards and D. C. Lloyd, *In vitro* transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes. *Mutat. Res.* **474**, 139–146 (2001).
  19. S. N. Gardner and J. D. Tucker, The cellular lethality of radiation-induced chromosome translocations in human lymphocytes. *Radiat. Res.* **157**, 539–552 (2002).
  20. P. J. Simpson, D. G. Papworth and J. R. Savage, X-ray-induced simple, pseudosimple and complex exchanges involving two distinctly painted chromosomes. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 11–18 (1999).
  21. J. D. Tucker, W. F. Morgan, A. A. Awa, M. Bauchinger, D. Blakey, M. N. Cornforth, L. G. Littlefield, A. T. Natarajan and C. Shasserre, A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenet. Cell Genet.* **68**, 211–221 (1995).
  22. M. N. Cornforth, Analyzing radiation-induced complex chromosome rearrangements by combinatorial painting. *Radiat. Res.* **155**, 643–659 (2001).
  23. K. M. Greulich, L. Kreja, B. Heinze, A. P. Rhein, H. G. Weier, M. Bruckner, P. Fuchs and M. Molls, Rapid detection of radiation-induced chromosomal aberrations in lymphocytes and hematopoietic progenitor cells by mFISH. *Mutat. Res.* **452**, 73–81 (2000).
  24. B. D. Loucas and M. N. Cornforth, Complex chromosome exchanges induced by gamma rays in human lymphocytes: An mFISH study. *Radiat. Res.* **155**, 660–671 (2001).
  25. M. Durante, K. George, H. Wu and F. A. Cucinotta, Karyotypes of human lymphocytes exposed to high-energy iron ions. *Radiat. Res.* **158**, 581–590 (2002).
  26. H. Wu, M. Durante, Y. Furusawa, K. George, T. Kawata and F. A. Cucinotta, M-FISH analysis of chromosome aberrations in human fibroblasts exposed to energetic iron ions *in vitro*. *Adv. Space Res.* **31**, 1537–1542 (2003).
  27. R. M. Anderson, V. V. Tsepenco, G. N. Gasteva, A. A. Molokanov, A. V. Sevan'kaev and D. T. Goodhead, mFISH analysis reveals complexity of chromosome aberrations in individuals occupationally exposed to internal plutonium: A pilot study to assess the relevance of complex aberrations as biomarkers of exposure to high-LET alpha particles. *Radiat. Res.* **163**, 26–35 (2005).
  28. H. Braselmann, U. Kulka, A. Baumgartner, C. Eder, I. Muller, M. Figel and H. Zitzelsberger, SKY and FISH analysis of radiation-induced chromosome aberrations: A comparison of whole and partial genome analysis. *Mutat. Res.* **578**, 124–133 (2005).
  29. M. P. Hande, T. V. Azizova, L. E. Burak, V. F. Khokhryakov, C. R. Geard and D. J. Brenner, Complex chromosome aberrations persist in individuals many years after occupational exposure to densely ionizing radiation: An mFISH study. *Genes Chromosomes Cancer* **44**, 1–9 (2005).
  30. M. N. Cornforth, K. M. Greulich-Bode, B. D. Loucas, J. Arsuaga, M. Vazquez, R. K. Sachs, M. Bruckner, M. Molls, P. Hahnfeldt and D. J. Brenner, Chromosomes are predominantly located randomly with respect to each other in interphase human cells. *J. Cell Biol.* **159**, 237–244 (2002).
  31. J. Arsuaga, K. M. Greulich-Bode, M. Vazquez, M. Bruckner, P. Hahnfeldt, D. J. Brenner, R. Sachs and L. Hlatky, Chromosome spatial clustering inferred from radiogenic aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.* **80**, 507–515 (2004).
  32. G. F. Merrill, Cell synchronization. In *Methods in Cell Biology*, Vol. 57, *Animal Cell Culture Methods* (J. P. Mather and D. Barnes, Eds.), pp. 229–249. Academic Press, San Diego, 1998.
  33. S. Knehr, H. Zitzelsberger and M. Bauchinger, FISH-based analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using different nomenclature systems. *Int. J. Radiat. Biol.* **73**, 135–141 (1998).
  34. R. K. Sachs, A. M. Chen, P. J. Simpson, L. R. Hlatky, P. Hahnfeldt and J. R. Savage, Clustering of radiation-produced breaks along chromosomes: Modelling the effects on chromosome aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 657–672 (1999).
  35. J. N. Lucas, A. Awa, T. Straume, M. Poggensee, Y. Kodama, M. Nakano, K. Ohtaki, H. U. Weier, D. Pinkel and J. Gray, Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **62**, 53–63 (1992).
  36. N. E. Morton, Parameters of the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7474–7476 (1991).
  37. S. Cigarran, L. Barrios, J. F. Barquinero, M. R. Caballin, M. Ribas and J. Egozcue, Relationship between the DNA content of human chromosomes and their involvement in radiation-induced structural



- aberrations, analysed by painting. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 449–455 (1998).
38. S. Vives, B. Loucas, M. Vazquez, D. J. Brenner, R. K. Sachs, L. Hlatky, M. Cornforth and J. Arsuaga, SCHIP: Statistics for chromosome interphase positioning based on interchange data. *Bioinformatics* **21**, 3181–3182 (2005).
  39. M. D. Spruill, M. J. Ramsey, R. R. Swiger, J. Nath and J. D. Tucker, The persistence of aberrations in mice induced by gamma radiation as measured by chromosome painting. *Mutat. Res.* **356**, 135–145 (1996).
  40. M. P. Hande and A. T. Natarajan, Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X-irradiation analysed by fluorescence *in situ* hybridization. IV. Dose response. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 441–448 (1998).
  41. Y. Xiao, F. Darroudi, M. Grigorova and A. T. Natarajan, Induction and persistence of chromosomal exchanges in mouse bone marrow cells following whole-body exposure to X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 1119–1128 (1999).
  42. J. D. Tucker, J. W. Breneman, J. F. Briner, G. G. Eveleth, R. G. Langlois and D. H. Moore 2nd, Persistence of radiation-induced translocations in rat peripheral blood determined by chromosome painting. *Environ. Mol. Mutagen.* **30**, 264–272 (1997).
  43. C. Lindholm and S. Salomaa, Dose assessment of past accidental or chronic exposure using FISH chromosome painting. *Radiat. Prot. Dosimetry* **88**, 21–25 (2000).
  44. I. Muller, H. Geinitz, H. Braselmann, A. Baumgartner, A. Fasan, R. Thamm, M. Molls, V. Meineke and H. Zitzelsberger, Time-course of radiation-induced chromosomal aberrations in tumor patients after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **63**, 1214–1220 (2005).
  45. L. G. Littlefield, A. F. McFee, A. M. Sayer, J. P. O'Neill, R. A. Kleinerman and M. H. Maor, Induction and persistence of chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to neutrons *in vitro* or *in vivo*: Implications of findings in 'retrospective' biological dosimetry. *Radiat. Prot. Dosimetry* **88**, 59–68 (2000).
  46. J. N. Lucas and R. K. Sachs, Using three-color chromosome painting to test chromosome aberration models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1484–1487 (1993).
  47. R. M. Anderson, S. J. Marsden, E. G. Wright, M. A. Kadhim, D. T. Goodhead and C. S. Griffin, Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 31–42 (2000).
  48. R. M. Anderson, S. J. Marsden, S. J. Paice, A. E. Bristow, M. A. Kadhim, C. S. Griffin and D. T. Goodhead, Transmissible and non-transmissible complex chromosome aberrations characterized by three-color and mFISH define a biomarker of exposure to high-LET alpha particles. *Radiat. Res.* **159**, 40–48 (2003).
  49. M. Vazquez, K. M. Greulich-Bode, J. Arsuaga, M. N. Cornforth, M. Bruckner, R. K. Sachs, L. Hlatky, M. Molls and P. Hahnfeldt, Computer analysis of mFISH chromosome aberration data uncovers an excess of very complicated metaphases. *Int. J. Radiat. Biol.* **78**, 1103–1115 (2002).
  50. H. Braselmann, M. Bauchinger and E. Schmid, Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. I. Derivation of formulae for the determination of transmission and survival parameters of aberrations. *Radiat. Environ. Biophys.* **25**, 243–251 (1986).
  51. M. Bauchinger, E. Schmid and H. Braselmann, Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. II. Experimental findings in human lymphocytes analysed in first and second post-irradiation metaphases. *Radiat. Environ. Biophys.* **25**, 253–260 (1986).
  52. P. Belloni, R. Meschini, D. Lewinska and F. Palitti, Apoptosis preferentially eliminates irradiated G<sub>0</sub> human lymphocytes bearing dicentric chromosomes. *Radiat. Res.* **169**, 181–187 (2008).
  53. J. F. Barquinero, S. Knehr, H. Braselmann, M. Figel and M. Bauchinger, DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence *in situ* hybridization painting of all chromosomes of a human female karyotype. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 315–323 (1998).
  54. H. Braselmann, U. Kulka, R. Huber, H. M. Figel and H. Zitzelsberger, Distribution of radiation-induced exchange aberrations in all human chromosomes. *Int. J. Radiat. Biol.* **79**, 393–403 (2003).
  55. H. Wu, M. Durante and J. N. Lucas, Relationship between radiation-induced aberrations in individual chromosomes and their DNA content: Effects of interaction distance. *Int. J. Radiat. Biol.* **77**, 781–786 (2001).
  56. M. Durante, K. George, H. Wu and F. A. Cucinotta, Karyotypes of human lymphocytes exposed to high-energy iron ions. *Radiat. Res.* **158**, 581–590 (2002).
  57. R. M. Anderson, N. D. Sumption, D. G. Papworth and D. T. Goodhead, Chromosome breakpoint distribution of damage induced in peripheral blood lymphocytes by densely ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **82**, 49–58 (2006).
  58. B. Pedersen and J. Ellegaard, A factor encoded by 7q31 suppresses expansion of the 7q- clone and delays cytogenetic progression. *Cancer Genet. Cytogenet.* **78**, 181–188 (1994).
  59. P. Philip and J. Pedersen-Bjergaard, Cytogenetic, clinical, and cytologic characteristics of radiotherapy-related leukemias. *Cancer Genet. Cytogenet.* **31**, 227–236 (1988).
  60. S. M. Smith, M. M. Le Beau, D. Huo, T. Karrison, R. M. Sobecks, J. Anastasi, J. W. Vardiman, J. D. Rowley and R. A. Larson, Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: The University of Chicago series. *Blood* **102**, 43–52 (2003).
  61. M. Plumb, Comments on the paper: Microsatellite instability in acute myelocytic leukaemia developed from A-bomb survivors—a biological perspective. *Int. J. Radiat. Biol.* **79**, 367–370; author reply 371–374 (2003).
  62. C. Graux, J. Cools, L. Michaux, P. Vandenberghe and A. Hagemeijer, Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: From thymocyte to lymphoblast. *Leukemia* **20**, 1496–1510 (2006).
  63. A. Khalil, J. L. Grant, L. B. Caddle, E. Atzema, K. D. Mills and A. Arneodo, Chromosome territories have a highly nonspherical morphology and nonrandom positioning. *Chromosome Res.* **15**, 899–916 (2007).
  64. L. A. Parada, P. G. McQueen, P. J. Munson and T. Misteli, Conservation of relative chromosome positioning in normal and cancer cells. *Curr. Biol.* **12**, 1692–1697 (2002).
  65. L. A. Parada, P. G. McQueen and T. Misteli, Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol.* **5**, R44 (2004).
  66. P. Fenaux, D. Lucidarme, J. L. Lai and F. Bauters, Favorable cytogenetic abnormalities in secondary leukemia. *Cancer* **63**, 2505–2508 (1989).
  67. W. Shali, C. Helias, C. Fohrer, S. Struski, C. Gervais, A. Falkenrodt, V. Leymarie, B. Lioure, P. Raby and M. Lessard, Cytogenetic studies of a series of 43 consecutive secondary myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukemias: Conventional cytogenetics, FISH, and multiplex FISH. *Cancer Genet. Cytogenet.* **168**, 133–145 (2006).
  68. H. Neves, C. Ramos, M. G. da Silva, A. Parreira and L. Parreira, The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: Evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* **93**, 1197–1207 (1999).
  69. S. Boyle, S. Gilchrist, J. M. Bridger, N. L. Mahy, J. A. Ellis and W. A. Bickmore, The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 211–219 (2001).
  70. H. Engels, T. Eggermann, A. Caliebe, A. Jelska, R. Schubert, H. M. Schuler, B. Panasiuk, J. Zaremba, A. Latos-Bielenska and A. T. Midro, Genetic counseling in Robertsonian translocations der(13;14): Frequencies of reproductive outcomes and infertility in 101 pedigrees. *Am. J. Med. Genet.* **146A**, 2611–2616 (2008).
  71. C. R. Rao and I. M. Chakravarti, Some small sample tests of significance for a Poisson distribution. *Biometrics* **12**, 264–282 (1956).



## 10. Agraïments

Tants anys fent el doctorat tens moltes persones a qui agrair moltes coses, començant pel departament d'Antropologia, primer lloc de la UAB on vaig aterrar (departament que encara me'l sento meu), on un cop acabat el Màster de Biologia Humana els meus directors em van proposar començar el doctorat i fer-ho al departament de Biologia Cel·lular, proposta que vaig acceptar i que mirant enrere m'alegro d'haver-ho fet, me'n alegro per tot el què hi he après, però sobretot perquè m'han envoltat persones molt maques que està clar que continuaran vinculades a la meva vida.

Vaig acceptar la proposta dels meus directors, el Leo i el Paquito, en part perquè l'experiència de fer el màster a Antropologia va ser molt positiva, i en part perquè la proposta no incloïa recerca amb animals, que encara que globalment per al progrés de la ciència és imprescindible, com podeu imaginar no està al meu abast. A més els vull agrair la seva confiança, paciència i generositat i fer-ho extensiu a la Maria Rosa C que en molts moments ha estat un punt de referència.

Per a mi ha estat un plaer compartir moments amb tothom, la majoria bons i és clar algun de no tant bo. Amb la Pilar, la Marta M i la Nerea n'he compartit molts i només m'han aportat coses positives, de vegades també m'han fet tocar de peus a terra que de tant en tant és necessari, amb la Pilar i la Nerea a més he compartit i encara comparteixo despatx, i ja se sap que tens una relació especial la gent amb qui comparteixes despatx, una llarga temporada va ser amb la Sheyla (suposo que la gent sabrà llegir el teu nom com cal), la Mariona, la Marta F, la Lydia, actualment amb l'Albert i el Dani i ja fa més temps amb la Laura L, la Mònica T, la Gema o el Cèsar entre d'altres, com ja he dit han estat molts anys i també molts canvis d'ubicació, i no sé per ells però a mi m'ha encantat compartir despatx amb ells i en recordo moments memorables. Però al Departament també hi ha més gent amb qui he compartit des de moments científics a culinàries i molts d'altres com la Cris C, la Laia M, l'Ester, la Zaida (que a nivell acadèmic darrerament sembla que tenim vides paral·leles), la Sílvia, la Dolors, la Fanny, la Montse P, el Josep S, l'Anna G, la Laura T, el Joan, l'Elena, el Nuno, la Judit, l'Òscar, la Irene, la Marta P, el Sergi, i més recentment la Laia H, l'Anna M, l'Anna G, la Tània, la Cris F, la Puri entre d'altres. Els laborants també m'han ajudat, la Jèssica, el Jonatan, el David i en especial el Marc a qui sobretot li he de donar les gràcies per ajudar-me en la antiga pràctica de les llagostes.

Per arribar al departament he passat moltes hores a la carretera, és el que té viure en un lloc només ben connectat a la UAB per carretera. He estat de sort de poder compartir-les tot fent la xerrada amb la Carme, la Teresa i especialment amb el Jaume que des del començament venim plegats i són moltes hores de converses i de contes en anglès.

En aquest temps hi ha hagut temps per a tot i per tant també per a treballar, en aquest sentit he estat una mica tastaolletes perquè Déu n'hi do els llocs on he treballat mentre feia el doctorat, a part del departament de biologia cel·lular, i a tots m'hi he sentit molt ben acollida i m'han donat la oportunitat de tastar el món laboral, també n'he après moltes coses i hi he conegut gent molt maca. És a dir que estic molt contenta d'haver estat a Echevarne, Prenatal Genetics, Cerba, General Lab, a Genètica de la UAB i on actualment estic vinculada de forma intermitent a l'Hospital Sant Joan de Déu on la Mar, l'Esther, la Teresa, la Lluïsa, la Isabel i l'Amèlia entre d'altres m'han ajudat i mimat.

Als amics, alguns vinculats a la UAB com al Sandra o la Marta S., però sobretot als no vinculats a la UAB, com la Nunilo, la Mònica, la Noemí, la Núria, l'Anna i més gent, que també m'ha recolzat, tot i que de vegades des de fora no s'acaba d'entendre molt bé ni què fas ni perquè ho fas, però malgrat això no deixen d'interessar-s'hi, animar-me i desintoxicar-me que no tot és ciència.

El meu fort no és escriure i espero que en aquest temps us hagi sabut transmetre d'altres formes el meu agraïment i estima, tant als que he esmentat en aquest petit text, com als que m'hagi pogut deixar perquè no seria la primera vegada que tinc algun "despiste" i us estic molt agraïda per donar-me suport, per fer-me riure i per fer-me sentir molt "especial".

