



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



Universitat Autònoma de Barcelona

**Dosimetria Biològica per exposicions a altes dosis de radiació
ionitzant i exposicions heterogènies**

Memòria presentada per
Mònica Pujol Canadell

Per optar al grau de
Doctora en Biodiversitat

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

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

Dr. Joan Francesc
Barquinero Estruch

Dr. Lleonard
Barrios Sanromà

Dra. María Rosa
Caballín Fernández

Mònica
Pujol Canadell

Universitat Autònoma de Barcelona
Cerdanyola del Vallès, Febrer de 2016

*Als meus,
als que hi són,
però també els que ja no hi són,*

“C'est le temps que tu as perdu pour ta rose qui fait ta
rose si importante”

Le Petit Prince

Antoine de Saint-Exupéry



“It is clear that there is no simple relationship between dosage and percentage of chromosome aberrations”

Genetics, 23, 494–516 (1938)

Karl Sax

AGRAÏMENTS

Ja està! Aquestes són les últimes línies del que he dedicat gran part dels últims 4 anys. Com tot, hi ha hagut moments molt bons: l'emoció quan un experiment nou surt, quan per fi el Metasystems fa el que tantes vegades has intentat que faci, quan reps un mail amb l'acceptació d'un article o quan per fi DIPOSITES LA TESI!!! Però evidentment, també n'hi ha hagut de molt desesperants que han fet que no hagi estat un camí fàcil. Malgrat tot, mirant enrere aquests últims anys, el meu balanç és molt positiu. I tot això evidentment no ho he fet sola, hi ha hagut molta gent que m'ha ajudat més o menys directament, i és per això que us vull donar les gràcies.

Primerament vull donar infinites gràcies als meus directors de tesi, per tot el que m'heu ensenyat, per donar-me la oportunitat d'entrar en el món de recerca i per fer possible que aquest projecte de tesi acabi en dipòsit. Paquito, Leo i María Rosa, MOLTES GRÀCIES!!!

Aquesta tesi té un gran contingut matemàtic que sense el Pere Puig no hauria estat possible. Moltes gràcies Pere, no només pels models sinó també per resoldre tots els meus dubtes sempre que ho he necessitat.

També volia donar les gràcies a les meves companyes i amigues de radiacions.

El meu agraïment etern a la Roser, per la seva rebuda, per ensenyar-me a fer cultius, extensions, a identificar dicèntrics, per ser-hi sempre i infinites coses més! Moltes gràcies Miss!!!

A la Mireia, la meva co! No puc imaginar-me una millor companya per la sala de micros, el lab, però també per totes les coses que hem fet fora de la UAB,

per les penes i alegries que hem compartit durant aquesta tesi, i per tot el que ens queda per compartir! Sense tu no hauria estat el mateix! Moltes gràcies Mi!!!

Maria's, Cabezas i Chicano, les meves companyes de despatx, gràcies per haver acceptat els meus shhhtttt!! Quan estava estressada, i juntament amb la Mar (que és com si haguéssim compartit despatx, tot i que ens separava el vidre) gràcies a totes tres pels vostres consells, i els 1000 dinars a la cuineta.

També voldria donar les gràcies a tots els professors de la Unitat (Gemma, Cristina, Maria Pilar, Assumpció i Eulàlia).

Durant aquests anys també ha passat gent per la unitat que tot i no compartir-hi tot el temps que ha durat la tesi també m'han acompanyat en algun moment.

Mariona, tu em vas ensenyar que el primer pas per escriure un article és tenir una llibreta ben maca on anotar el que anaves llegint i tant o més important, on ho llegies. Savi consell entre tants d'altres. Moltes gràcies!!

Lydia, gràcies per ensenyar-me a veure que el que pot semblar molt greu mai ho és tan! A més d'altres divertides filosofades.

Maria G, Marta M, Cintia, Ana, Jenny, Maria F, Marc, Amanda, Nika, Cristina A i Gemma gràcies per les bones estones que hem compartit.

Gràcies per l'ajuda i pel "carinyo" de les tècnics de la unitat: la Núria, la Jessica i sobretot la Pilar, la meva mami del lab!

Al Pere i la Rut, els reis dels Mojitos! tot i que no us veig tant com m'agradaria, sempre hi sou, gràcies!!

Fora la unitat també voldria donar les gràcies a tots aquests que heu estat amb mi, m'heu distret quan ha calgut i també m'heu preguntat com anava la tesi sense por al rollo que venia després!

A les meves amigues de Banyoles i rodalies (Irene M, Irene S, Sandra, Lidi, Helen, Eli, Meri, Sònia S, Alba i Sònia H) a les "compis de bio" (Montserrat, Maku, Meri, Cris i Marta) i les meves companyes de pis (Anna i Judit). Finalment voldria donar les gràcies a la meva família; Als meus pares, per estar allà quan ho he necessitat i sobretot a la Laia que tot i ser la germana petita sempre m'ha intentat entendre i recolzar.

1. INTRODUCCIÓ	15
1.1. Mecanismes d'acció de les radiacions ionitzants (RI) en les biomolècules	17
1.1.1. Interacció de la RI amb les membranes i les proteïnes cel·lulars	19
1.1.2. Interacció de les RI amb el DNA	20
1.1.2.1. Detecció del dany radioinduit en el DNA	21
1.1.2.2. Control de la progressió del cicle cel·lular	22
1.1.2.2.1. Checkpoint G1/S	23
1.1.2.2.2. Checkpoint S	25
1.1.2.2.3. Checkpoint G2/M	26
1.1.2.2.4. Checkpoint de sortida de la mitosi	28
1.1.2.3. Reparació del dany radioinduit	30
1.1.2.3.1. Reparació no homòloga (NHEJ)	30
1.1.2.3.2. Reparació per recombinació homòloga (HRR)	31
1.1.3. Formació d'alteracions cromosòmiques	33
1.1.4. Tipus d'alteracions cromosòmiques	34
1.2. Protecció radiològica	36
1.3. Dosimetria biològica	37
1.3.1 Definició i metodologies utilitzades	37
1.3.2. Corbes dosi-efecte per cromosomes dicèntrics	40
1.3.2.1. Estimació de la dosi rebuda en casos d'exposició a RI total i homogènia	43
1.3.2.2. Estimació de la dosi rebuda en casos d'exposicions no homogènies	44
1.3.2.3. Estimació de la dosi rebuda després d'exposicions a altes dosis de radiació	47
2. OBJECTIUS	51
3. RESULTATS	55
3.1. Treball 1: A new model of biodosimetry to integrate low and high doses	57
3.2. Treball 2: A new model for biological dose assessment in cases of heterogeneous exposures to ionizing radiation	91
4. DISCUSSIÓ	119
4.1. Corbes dosi-efecte per a estimar exposicions a dosis molt elevades de RI	121
4.1.1. Optimització del cultiu de limfòcits amb cafeïna per a l'anàlisi citogenètica	121

4.1.2. Elaboració d'una corba dosi-efecte mitjançant el recompte de dicèntrics a dosis entre 0 i 25 Gy.....	123
4.1.3. Validació del nou model Gompertz de corba dosi-efecte per a altes dosis.....	127
4.2. Desenvolupament d'una nova metodologia per l'estudi d'exposicions no homogènies a RI.....	128
4.2.1. Valoració de la mixtura de Poissons per l'estimació de la freqüència de dicèntrics.....	129
4.2.2. Valoració de l'estimació de dosi en irradiacions no homogènies.....	132
4.2.3. Valoració del càlcul de la fracció inicial de cèl·lules irradiades a cada dosi.....	132
5. CONCLUSIONS.....	135
6. BIBLIOGRAFIA.....	139
7. ANNEX.....	153

1. INTRODUCCIÓ

1. Introducció

La radiobiologia és un àmbit de la ciència que estudia els fenòmens biològics que es produeixen en els éssers vius un cop s'absorbeix l'energia procedent de les radiacions ionitzants (RI) (Hall i Giaccia, 2006).

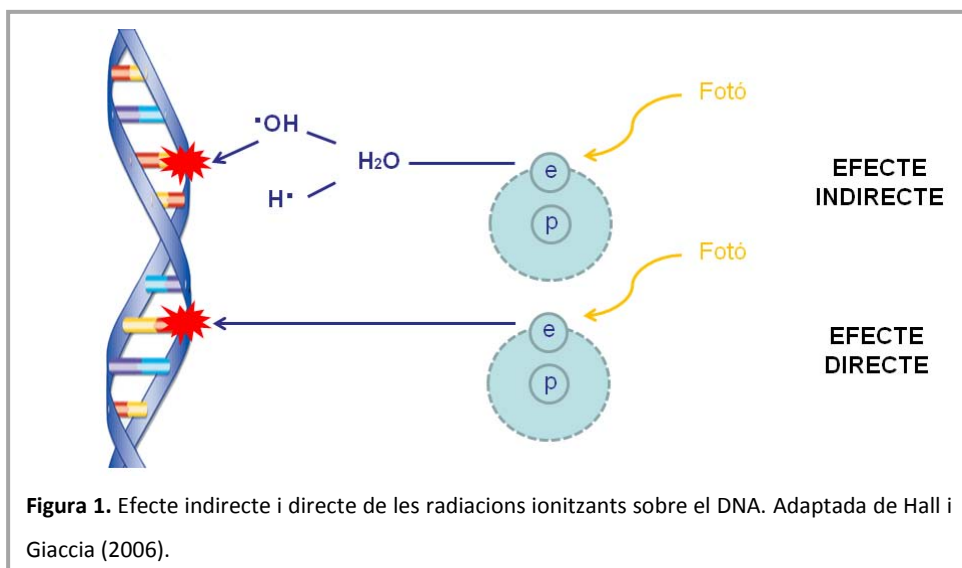
L'energia de les RI, que pot provenir de fotons (raigs X i raigs γ) o de partícules (α , β , neutrons, etc.), en interaccionar amb la matèria provoca ionitzacions i excitacions de les molècules que componen el material travessat. Quan aquest material són els éssers vius, l'absorció de l'energia de les RI pot tenir conseqüències biològiques importants, podent afectar a lípids, proteïnes i àcids nucleics, essent les alteracions en el material genètic les que tenen un efecte més important.

Els efectes de les RI a la salut es poden classificar en estocàstics i determinístics. Els efectes estocàstics es poden presentar en l'individu exposat o els seus descendents un temps després de que hagi tingut lloc l'exposició a RI i no tenen una dosi llindar per sota de la qual no hi ha l'efecte. En aquests casos l'exposició a RI implica un increment en la probabilitat, com per exemple de patir un càncer radioinduït. Els efectes determinístics són aquells que impliquen disfunció tissular, i es deuen principalment al dany cel·lular radioinduït. Els efectes determinístics, a diferència dels estocàstics, apareixen a partir d'una dosi llindar i la seva severitat augmenta amb la dosi. Alguns exemples en són els eritemes cutanis, les nàusees i l'opacitat del cristal·lí.

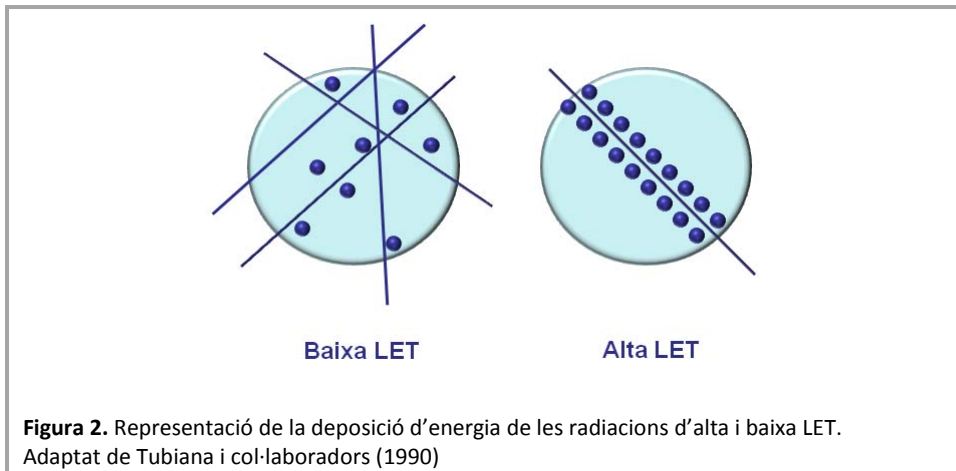
1.1. Mecanismes d'acció de les RI en les biomolècules

La interacció entre les RI i les biomolècules es pot produir de dues maneres: Efecte directe, quan no hi intervé cap altra espècie química, o efecte indirecte quan les RI interaccionen amb altres compostos químics presents a les cèl·lules,

com ara l'aigua produint radicals lliures que reaccionen amb les biomolècules com el DNA (Figura 1) (Hall i Giaccia, 2006).



Per valorar l'efecte biològic de les RI s'ha de considerar la dosi de l'energia absorbida i com es diposita. La dosi absorbida és l'energia dipositada per unitat de massa, que en el sistema internacional s'expressa en gray (Gy), i que és l'equivalent a l'absorció d'un joule per quilogram de matèria ($\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}$). Per valorar com es diposita l'energia a la matèria, s'utilitza la transferència lineal d'energia (LET), que és l'energia mitjana transferida per unitat de longitud i s'expressa en $\text{keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$. Considerant això, es poden diferenciar les radiacions de baixa LET, que produeixen poques ionitzacions per micròmetre de recorregut (radiació γ i els raigs X), i les radiacions d'alta LET, que produeixen moltes ionitzacions per unitat de longitud (partícules α , β , neutrons, etc.) (Figura 2).



1.1.1. Interacció de les RI amb les membranes i les proteïnes cel·lulars

Les RI poden provocar danys en les membranes cel·lulars per la modificació de fosfolípids que en són els constituents majoritaris. Els radicals lliures, generats per la hidròlisi de l'aigua, són susceptibles de provocar la peroxidació d'àcids grassos insaturats, modificant l'estructura i funció de les membranes cel·lulars (Repetto et al., 2012).

Les cèl·lules contenen un gran nombre de proteïnes diferents que participen en un gran nombre de funcions. La interacció de les RI amb les proteïnes pot donar-se de manera directa o indirecta, a través de la hidròlisi de l'aigua. Això pot generar modificacions estructurals (fragmentació, reorganització i modificacions d'aminoàcids) i també poden haver-hi modificacions funcionals, que provoquin la pèrdua d'activitat enzimàtica o l'alteració del procés de proteòlisi. Les modificacions observades més freqüentment són l'oxidació química i la carboxilació, provocant desnaturalització i inactivació de les proteïnes (Daly, 2012).

1.1.2. Interacció de les RI amb el DNA

La interacció de les RI amb la molècula de DNA pot produir diferents tipus de lesions. Les més simples impliquen trencament d'una de les dues cadenes ("Single Strand Breaks", SSB), producció de llocs abàsics ("Apurinic and Apyrimidimic sites", AP-sites) i danys de base ("Base Damage", BD). També poden generar altres lesions com els trencaments de doble cadena ("Double Strand Breaks", DSB), que són les que tenen un efecte biològic més important i d'altres més complexes, com regions amb dany múltiple en el DNA (Chadwick i Leenhouts, 1981; Natarajan, 1984; Georgakilas, 2008). Aquestes darreres poden incloure un o més DSB, SSB o BD essent més difícils de reparar que les alteracions simples i per tant amb un potencial més elevat de produir alteracions cromosòmiques (AC) (IAEA, 2011) (Figura 3).

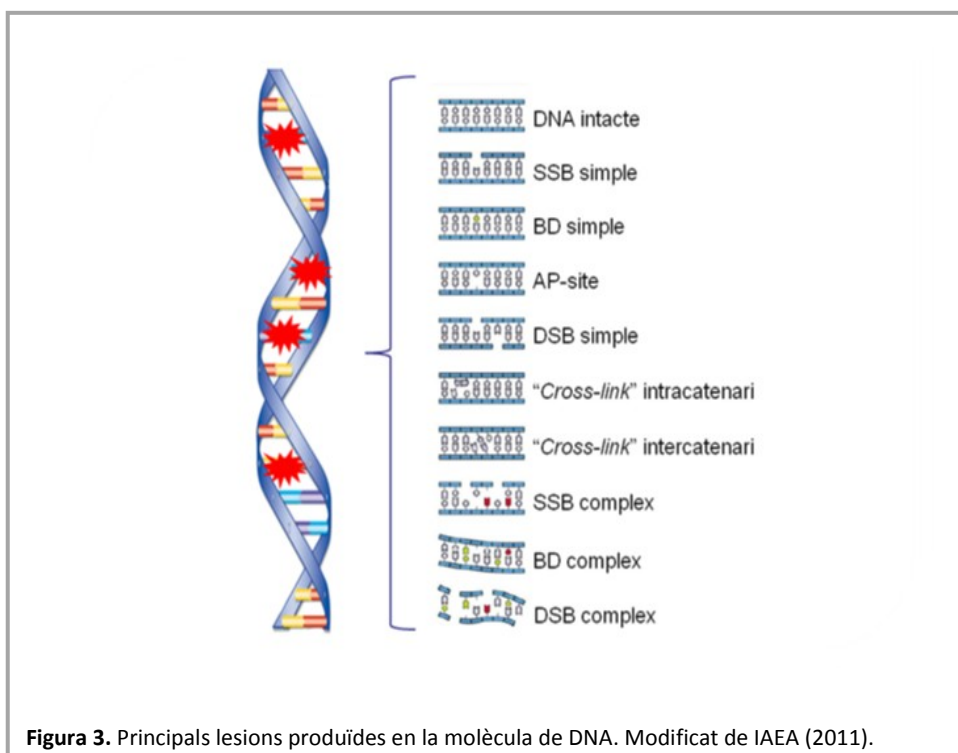
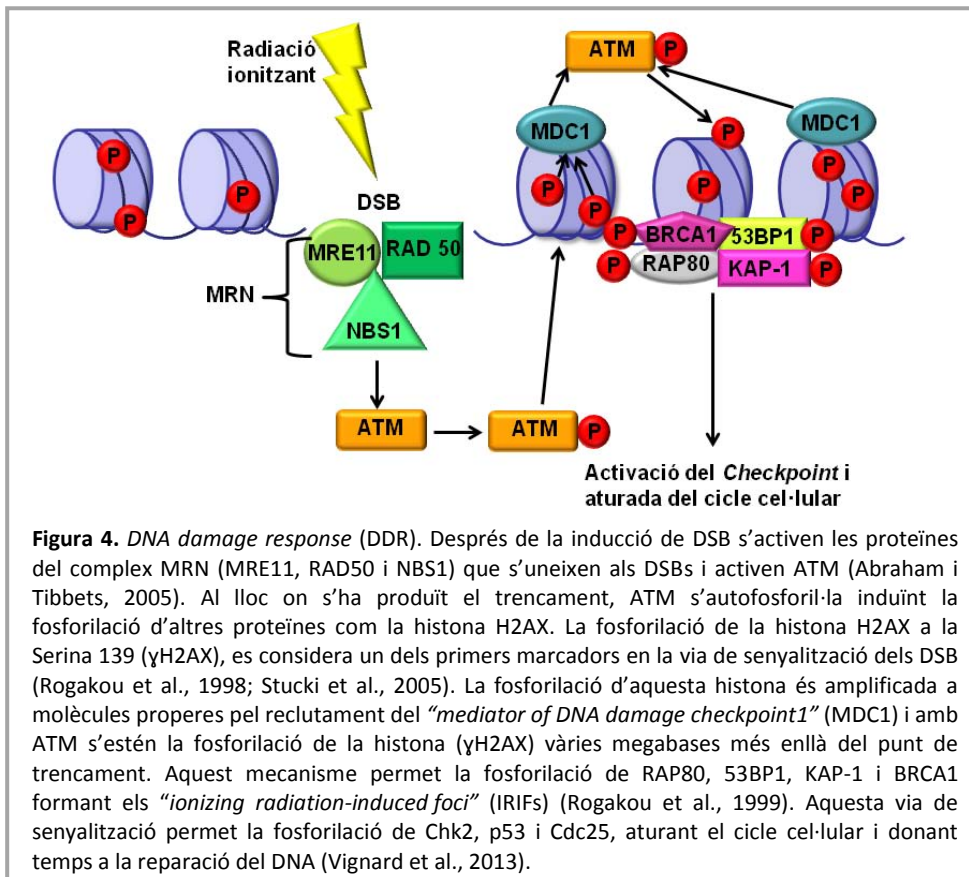


Figura 3. Principals lesions produïdes en la molècula de DNA. Modificat de IAEA (2011).

1.1.2.1. Detecció del dany radioinduit en el DNA

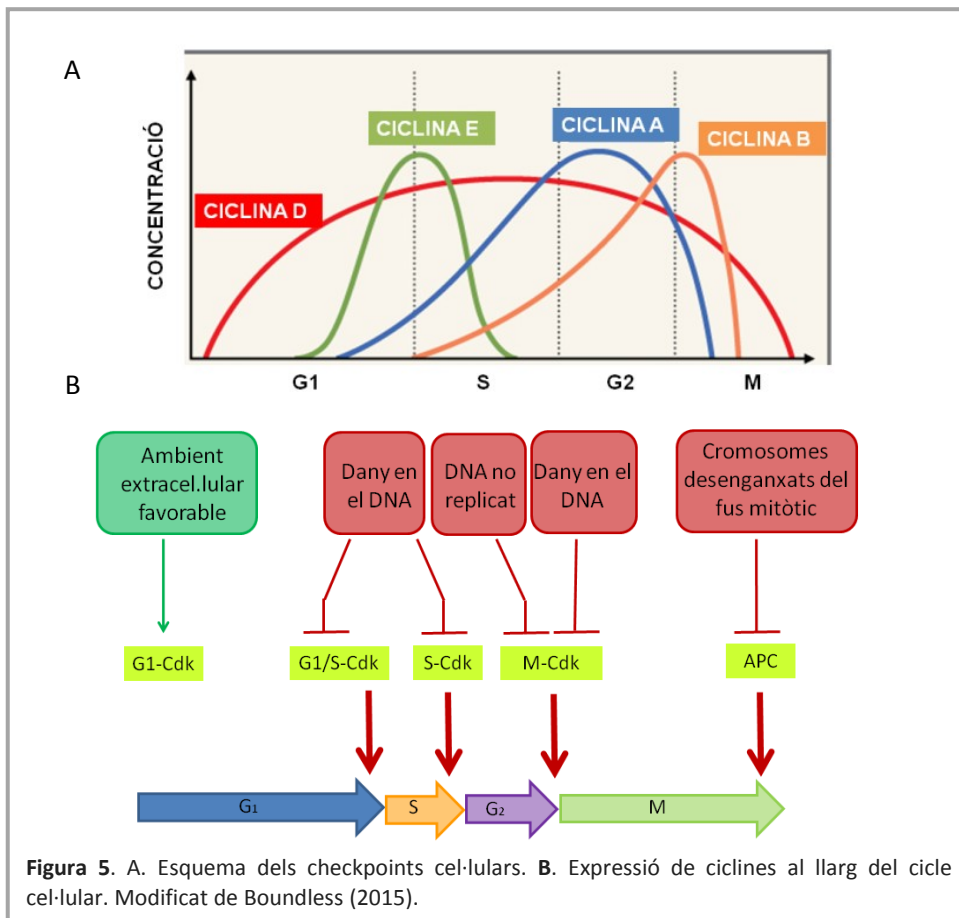
En les cèl·lules de mamífer, la inducció de dany en el DNA provoca una resposta cel·lular (*DNA damage response*, DDR) que involucra als mecanismes de control del cicle cel·lular i les vies de reparació del DNA (Polo i Jackson, 2011). L'activació de la DDR implica a proteïnes detectores, mediadores i efectores. De manera general, les proteïnes detectores són les responsables del reconeixement del dany, i l'activació dels factors de transcripció, encarregats de l'amplificació de la senyal a través de les proteïnes mediadores, així com de l'activació de proteïnes efectores. Aquestes són responsables de l'alentiment i aturada del cicle cel·lular, per tal que puguin actuar els mecanismes de reparació. Pel que fa als DSB, els detalls de l'activació de la DDR es resumeixen a la Figura 4.



1.1.2.2. Control de la progressió del cycle cel·lular

El dany induït a la molècula de DNA després de l'exposició a RI provoca l'alentiment o fins i tot, l'aturada de la progressió del cycle cel·lular en els punts de control o checkpoints cel·lulars. El cycle cel·lular de les cèl·lules eucariotes consisteix en quatre fases, i és en el pas de cada fase on es troben majoritàriament els checkpoints, que estan regulats per les ciclines i les cinases dependents de ciclines (Cdks).

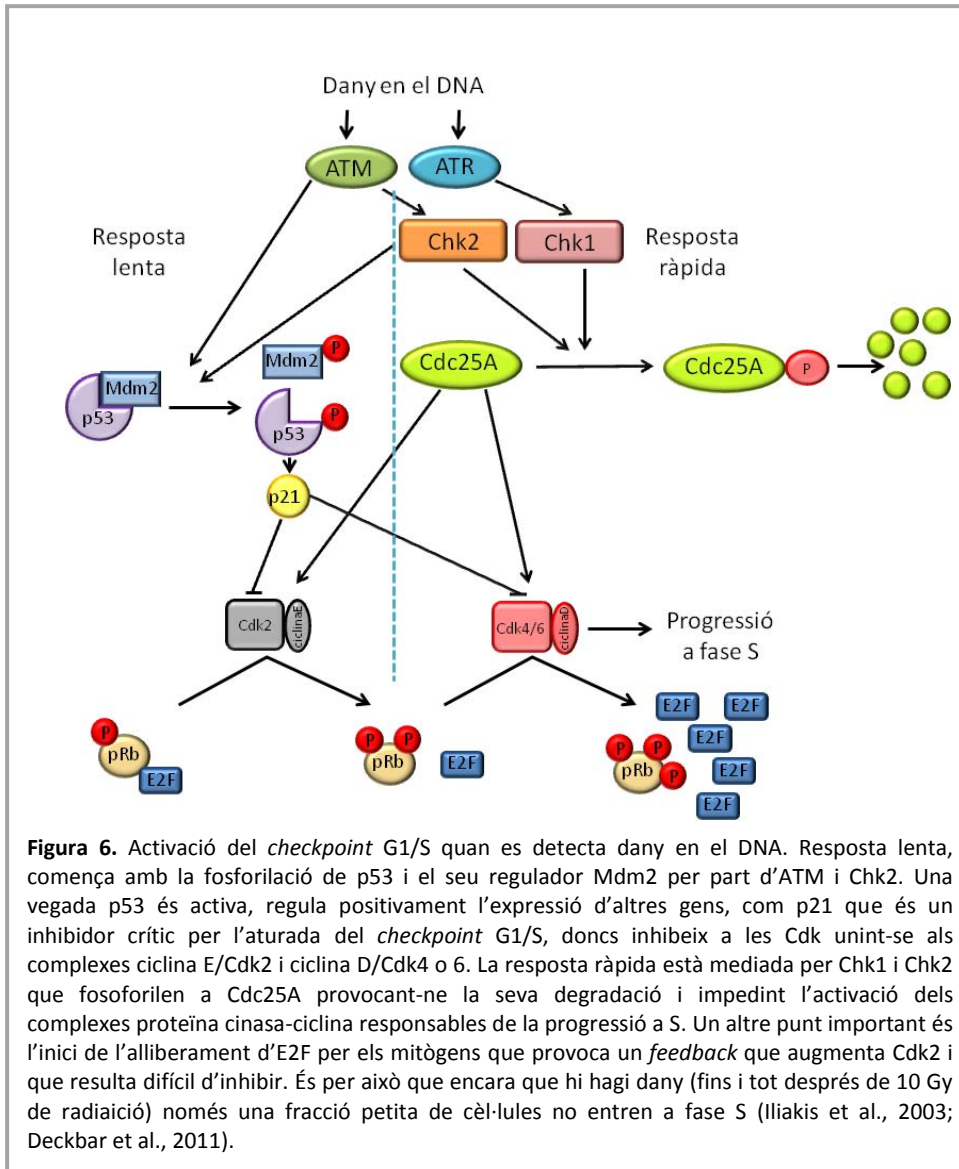
Les ciclines són proteïnes petites que s'expressen i es degraden al llarg del cycle cel·lular, mentre que les Cdks estan presents durant tot el cycle, essent actives només quan estan unides a les ciclines (Figura 5).



1.1.2.2.1. *Checkpoint G1/S*

El *checkpoint* del final de la fase G1 impedeix que comenci la replicació si el DNA presenta danys. De manera natural els mitògens estimulen l'expressió de ciclina D que s'associa a la Cdk4 o 6 depenent del tipus cel·lular. L'activació del complex de la ciclina D/Cdk4 o 6 té diferents dianes, una de les quals és la proteïna retinoblastoma (pRb) que en el seu estat hiperfosforilat allibera E2F, necessari per la replicació. E2F activa la transcripció de la ciclina E que s'uneix a Cdk2, a la vegada que allibera completament la repressió de pRb generant d'aquesta manera un *feedback* positiu.

En les cèl·lules que presenten danys al DNA a la fase G1, s'activen cascades de senyalització que inactiven els complexos que regulen l'entrada en fase S (ciclina D/Cdk4 o 6 i la ciclina E/Cdk2). S'han descrit dos mecanismes diferents per regular-ho, una resposta anomenada "resposta lenta" que implica canvis en la transcripció dels gens, i una "resposta ràpida" que és menys sensible, ja que inhibeix l'activació de Cdks però no inhibeix a les Cdks que ja han estat activades (Buscemi et al., 2004). Els detalls del funcionament d'ambdues vies es poden veure a la Figura 6.



1.1.2.2.2. Checkpoint S

El *checkpoint* de S comprova que no hi hagi danys en el DNA abans de la replicació i evita que les forques de replicació avancin quan hi ha DSBs. Per tal que tingui lloc el progrés durant la fase S, la proteïna Cdk2 ha d'estar desfosforilada. El dany en el DNA activa ATM, i aquesta la resta de la via, ja que impedeix que Cdc45 actuï en el reclutament de la DNA polimerasa α en la cromatina i que es doni la replicació del DNA (Iliakis et al., 2003; Couch et al., 2013). Els detalls del procés poden veure's a la Figura 7.

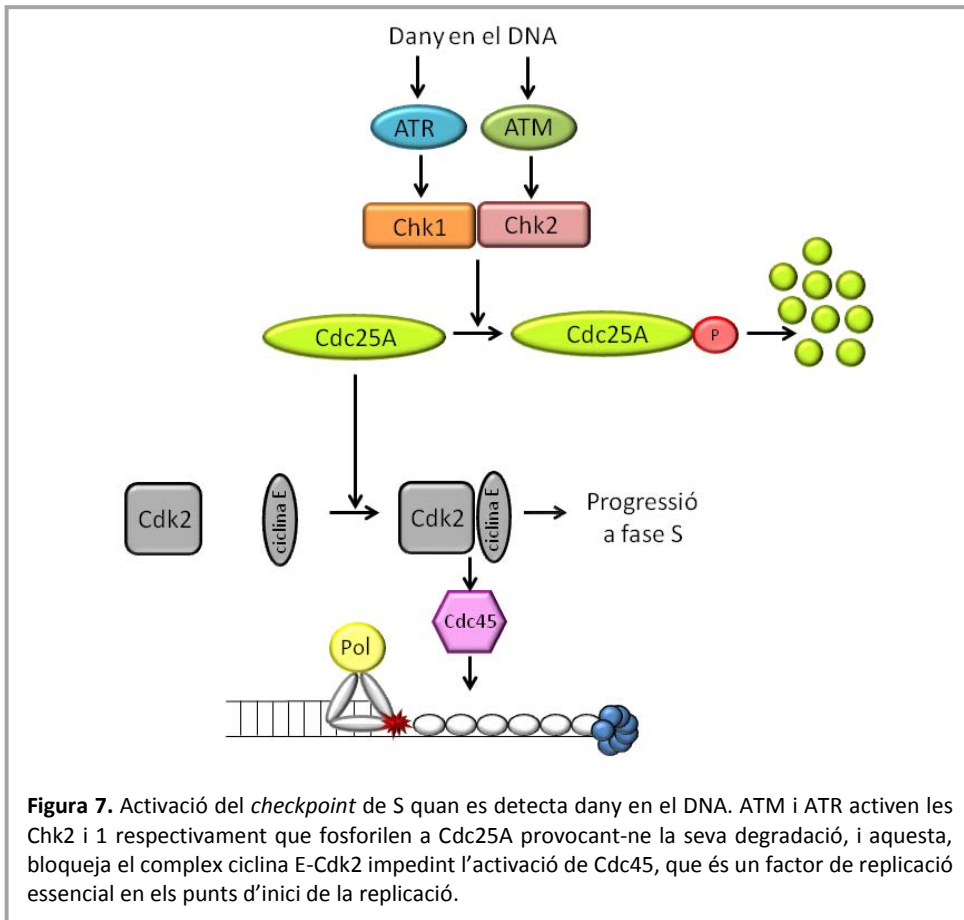
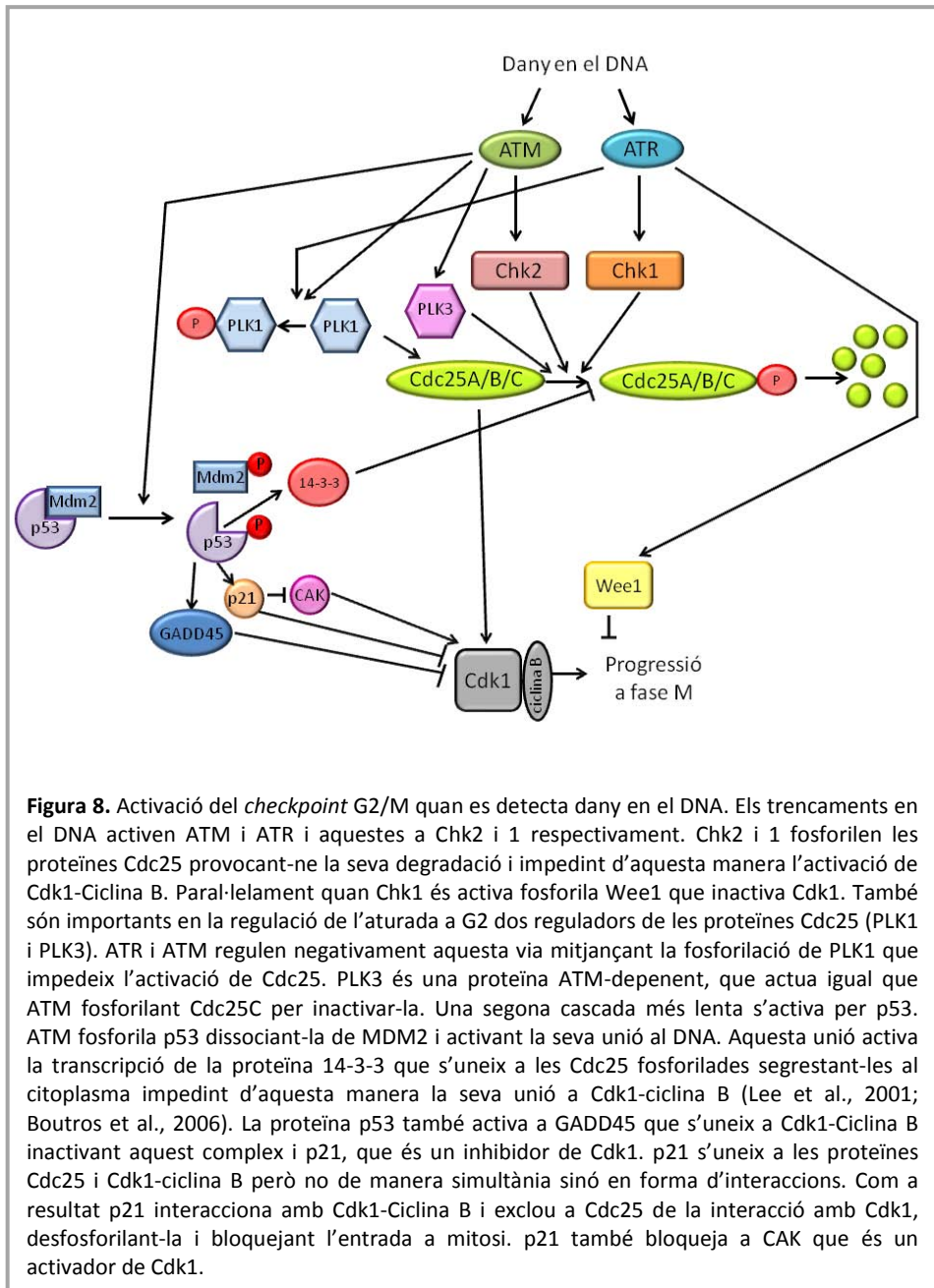


Figura 7. Activació del *checkpoint* de S quan es detecta dany en el DNA. ATM i ATR activen les Chk2 i 1 respectivament que fosforilen a Cdc25A provocant-ne la seva degradació, i aquesta, bloqueja el complex ciclina E-Cdk2 impedit l'activació de Cdc45, que és un factor de replicació essencial en els punts d'inici de la replicació.

1.1.2.2.3. Checkpoint G2/M

El *checkpoint* G2/M evita que entrin en mitosi cèl·lules que no han acabat la replicació del DNA o bé que mostren danys al DNA que no han estat reparats. En una cèl·lula normal, el moment clau pel pas a mitosi és l'activació del complex Cdk1-Ciclina B, altrament conegut com a factor promotor de la maduració (MPF). Aquest complex es forma en les fases S i G2, la proteïna CAK fosforila el residu Thr161 de la Cdk1 i la cinasa Wee1 els residus Thr14 i Tyr15. En el moment de l'activació del complex, Cdc25 desfosforila els residus 14 i 15 provocant l'entrada al nucli i l'activació necessària per iniciar la mitosi. De la mateixa manera que a la resta de *checkpoints*, la inactivació del complex cinasa-ciclina provoca el bloqueig del cicle cel·lular impedit a la cèl·lula arribar a mitosi (Iliakis et al., 2003).

Hi ha diferents vies que provoquen el bloqueig de G2/M, moltes d'elles convergeixen en la inhibició de Cdk1. Els detalls del seu funcionament, així com les proteïnes implicades es poden veure a la Figura 8.



1.1.2.2.4. *Checkpoint* de sortida de la mitosi

De manera general, el DNA replicat es condensa i s'empaqueta per formar les cromàtides germanes que es separen abans de formar-se les cèl·lules filles.

En metafase, les cromàtides germanes s'enganxen al fus mitòtic pels cinetocors que són complexos proteics que s'uneixen al DNA dels centròmers. Una vegada les cromàtides estan unides al fus, els cinetocors estan sota tensió i la ubiquitina lligasa del complex promotor de l'anafase (APC) activa el mecanisme que permet a les cèl·lules progressar cap a anafase.

En l'anafase, el *checkpoint* de sortida de la mitosi comprova la unió de totes les cromàtides germanes al fus, i les proteïnes que formen el complex del *checkpoint* de sortida de la mitosi (MCC) es dissocien permetent la progressió a anafase. Quan la unió de les cromàtides al fus no és correcta, el complex MCC no es dissocia bloquejant l'activació d'APC i impeding el pas a anafase. Els detalls del procés es poden veure a la Figura 9.

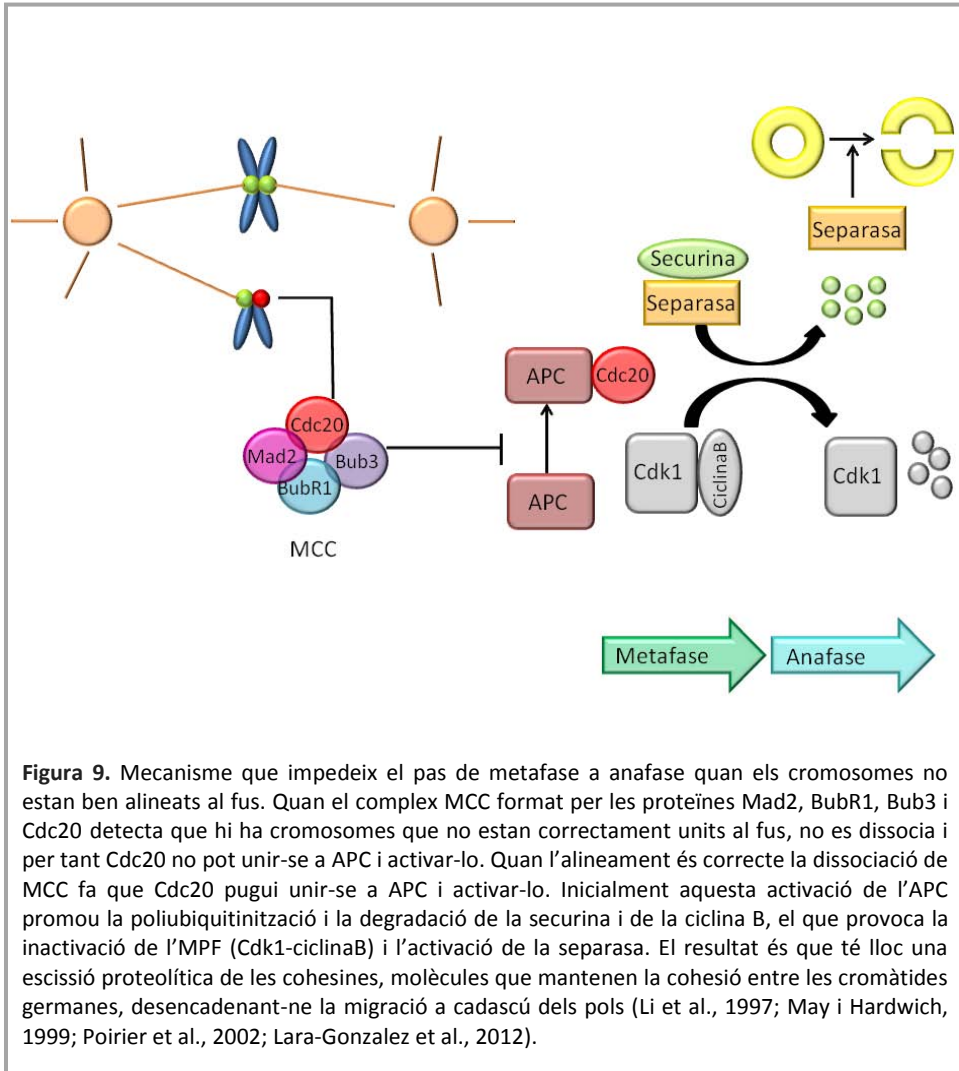


Figura 9. Mecanisme que impedeix el pas de metafase a anafase quan els cromosomes no estan ben alineats al fus. Quan el complex MCC format per les proteïnes Mad2, BubR1, Bub3 i Cdc20 detecta que hi ha cromosomes que no estan correctament units al fus, no es dissocia i per tant Cdc20 no pot unir-se a APC i activar-lo. Quan l'alineament és correcte la dissociació de MCC fa que Cdc20 pugui unir-se a APC i activar-lo. Inicialment aquesta activació de l'APC promou la poliubiquitinització i la degradació de la securina i de la ciclina B, el que provoca la inactivació de l'MPF (Cdk1-ciclinaB) i l'activació de la separasa. El resultat és que té lloc una escissió proteolítica de les cohesines, molècules que mantenen la cohesió entre les cromàtides germanes, desencadenant-ne la migració a cadascú dels pols (Li et al., 1997; May i Hardwich, 1999; Poirier et al., 2002; Lara-Gonzalez et al., 2012).

1.1.2.3. Reparació del dany radioinduït

L'alentiment i/o l'aturada del cicle cel·lular quan hi ha danys al DNA, dona temps a que puguin actuar els mecanismes de reparació. Hi ha lesions, com els DB, els "AP-sites" i els SSB que es reparen per processos d'escissió de base (BER), escissió de nucleòtid (NER), i de reparació de trencaments de cadena simple (SSBR), que utilitzen la cadena intacta com a motlle per dur a terme la reparació (Caldecott, 2007; Fortini i Dogliotti, 2007). En canvi, els DSB, són lesions que afecten a les dues cadenes del DNA i es reparen per dues vies clau, la reparació dels DSB són la reparació no homòloga ("*non-homologous end joining*", NHEJ) i la reparació per recombinació homòloga ("*homologous recombination repair*", HRR) (Hall i Giaccia, 2006; Dueva i Iliakis, 2013).

1.1.2.3.1. Reparació no homòloga (NHEJ)

La NHEJ es considera el mecanisme principal de reparació dels DSB radioinduïts en cèl·lules humanes. Aquesta via està activa durant tot el cicle cel·lular i es tracta d'un procés molt ràpid que actua 10-30 minuts després de que s'hagi produït el dany, lligant els extrems del DNA fragmentat (Rothkamm et al., 2003; Natarajan i Palitti, 2008; Dueva i Iliakis, 2013). Sovint els extrems generats per les RI tenen grups no lligables, és per això que la reparació per NHEJ requereix del processament dels extrems abans de ser lligats. Degut a les modificacions o pèrdua de nucleòtids que es poden introduir durant el processament, la via de reparació per NHEJ pot produir modificacions en la seqüència de DNA original (Shrivastav et al., 2008). Els detalls del procés es poden veure a la Figura 10.

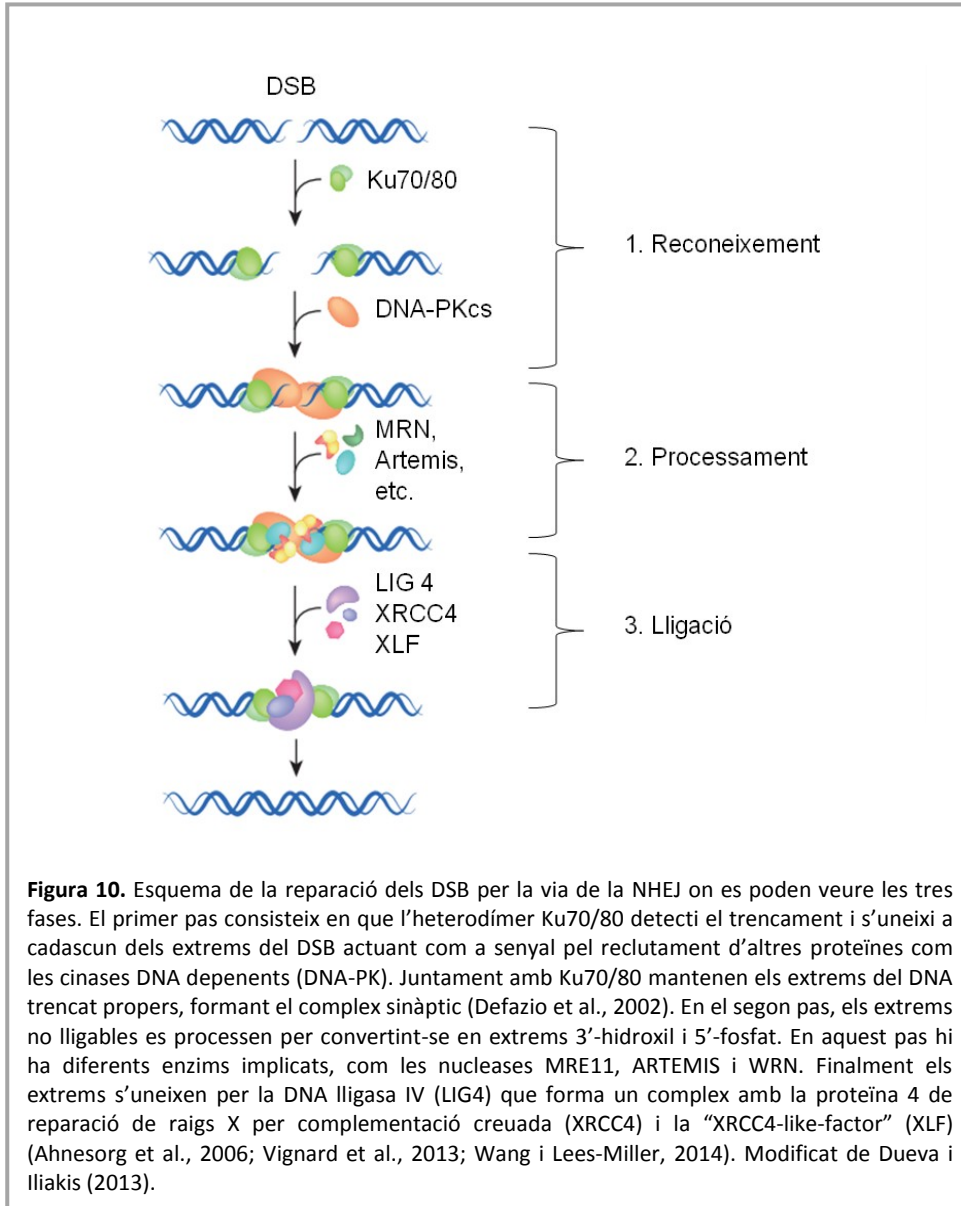
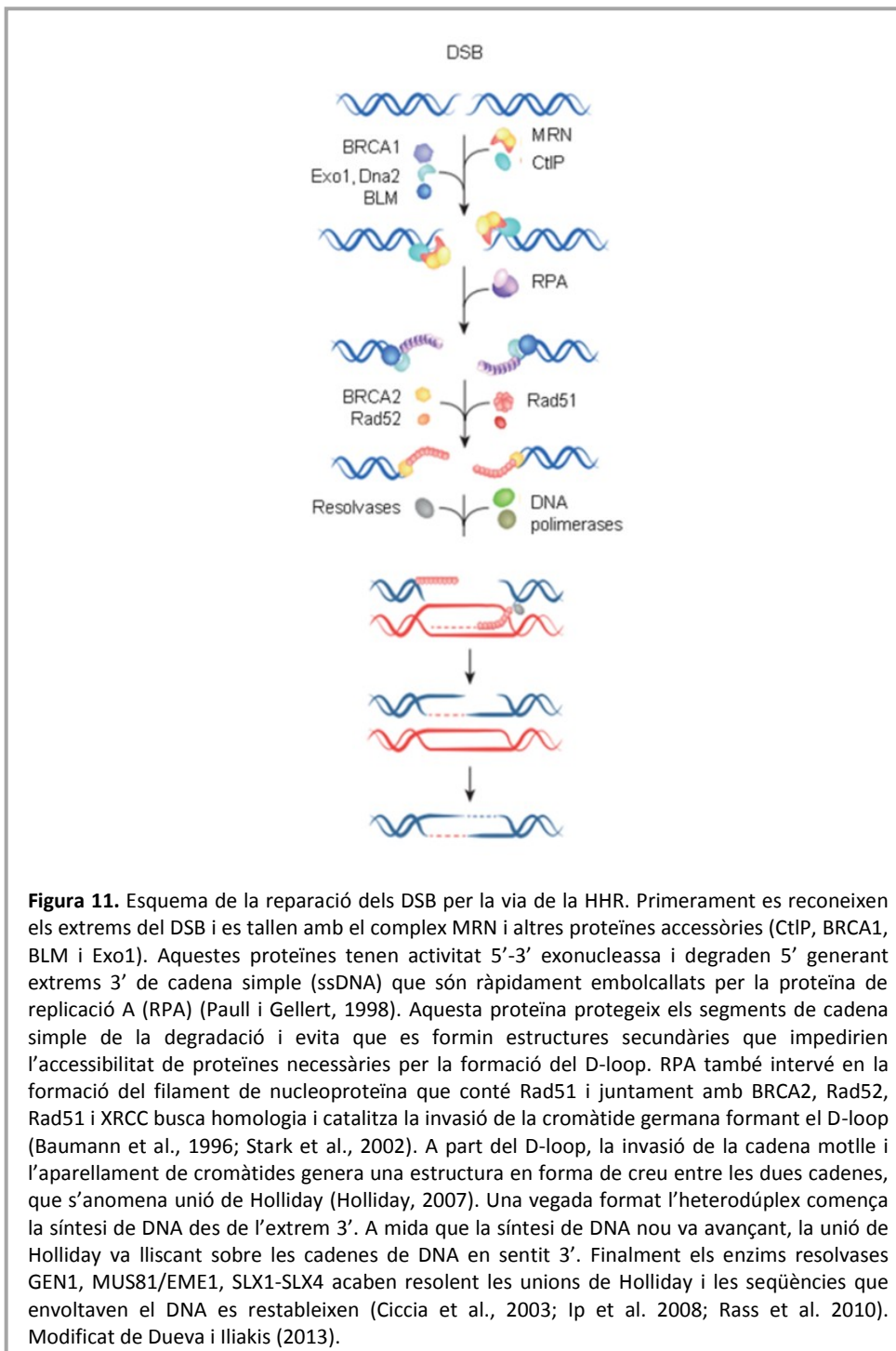


Figura 10. Esquema de la reparació dels DSB per la via de la NHEJ on es poden veure les tres fases. El primer pas consisteix en que l'heterodímer Ku70/80 detecti el trencament i s'uneixi a cadascun dels extrems del DSB actuant com a senyal pel reclutament d'altres proteïnes com les cinases DNA dependents (DNA-PK). Juntament amb Ku70/80 mantenen els extrems del DNA trencat propers, formant el complex sinàptic (Defazio et al., 2002). En el segon pas, els extrems no lligables es processen per convertint-se en extrems 3'-hidroxil i 5'-fosfat. En aquest pas hi ha diferents enzims implicats, com les nucleases MRE11, ARTEMIS i WRN. Finalment els extrems s'uneixen per la DNA lligasa IV (LIG4) que forma un complex amb la proteïna 4 de reparació de raigs X per complementació creuada (XRCC4) i la "XRCC4-like-factor" (XLF) (Ahnesorg et al., 2006; Vignard et al., 2013; Wang i Lees-Miller, 2014). Modificat de Dueva i Iliakis (2013).

1.1.2.3.2. Reparació per recombinació homòloga (HRR)

La HRR és una via de reparació que té una fidelitat en la reparació de la seqüència de DNA més alta que la NHEJ. Això es deu a que utilitza la cromàtide germana intacte com a motlle per la reparació. Per això la HRR està restringida a

les fases S i G2 del cicle cel·lular (Johnson i Jasin, 2000). Els detalls del procés es poden veure a la Figura 11.



1.1.3. Formació d'alteracions cromosòmiques

La inducció de danys en la molècula de DNA per les RI fa que en metafase es puguin detectar alteracions cromosòmiques (AC).

Històricament s'han proposat tres models per explicar la formació de AC induïdes per les RI:

El primer és el model de ruptura i reunió "breakage-and-reunion" (Sax, 1938; Lea i Catheside, 1942). A nivell molecular equivaldria a la NHEJ i es basa en que les RI indueixen un trencament en un cromosoma deixant dos extrems que:

- 1- Es reparen reconstruint el cromosoma original.
- 2- Es reparen unint-se a extrems oberts d'un altre trencament, proper al primer en espai i temps, fent que es formin intercanvis.
- 3- No es reparen i arriben a metafase com a delecions terminals.

El segon model és el d'intercanvi Revell (1955). Originalment es va desenvolupar per explicar alteracions de tipus cromàtide. Proposa que el primer efecte de les RI no és un trencament del cromosoma, sinó una lesió inestable, que si es repara no dona lloc a alteracions. Si dues lesions inestables coincideixen en el temps i l'espai, poden formar una alteració de tipus intercanvi. Aquest model implica que totes les alteracions es formen com a resultat d'un procés d'intercanvi, i que perquè això es pugui dur a terme, és necessari un procés de contacte entre les dues cromàtides (bucles de cromàtide o bucles de Revell). A nivell molecular aquest model equivaldria a la HRR.

El tercer model és l'anomenat "one-hit", o de recombinació d'homòlegs (Chadwick i Leenhouts, 1981). Suggereix que les delecions i els intercanvis s'originen a partir d'un sol DSB i que els mecanismes de reparació són els responsables de la inducció d'un segon trencament en la cadena de DNA no

danyada, que presenta regions d'homologia amb la primera. Els intercanvis produïts d'aquesta forma podrien explicar la interacció de les ruptures distants, problema que planteja el model 1 (Savage, 1996). A nivell molecular, aquest també equivaldria a la HRR. La teoria 1 de ruptura i reunió és el més acceptat, no obstant, existeixen evidències experimentals de que la formació d'alteracions cromosòmiques hi intervenen mecanismes proposats en els tres models (Edwards, 2002).

1.1.4. Tipus d'alteracions cromosòmiques

Les AC estructurals es classifiquen en cromatídiques i cromosòmiques.

AC cromatídiques: Són degudes a lesions produïdes quan ja s'ha completat la fase de síntesi de DNA (S), és a dir en la fase G2 del cicle cel·lular, i per tant el dany que s'observarà en metafase només afectarà a una cromàtide.

AC cromosòmiques: Són degudes a lesions produïdes en les fases G0 o G1 del cicle cel·lular, és a dir, abans de la síntesi del DNA. El dany afectarà al cromosoma sencer, manifestant-se en metafase en les dues cromàtides en el mateix nivell.

Les AC també es poden classificar segons si hi estan implicats un o més cromosomes.

AC amb un sol cromosoma implicat: Poden donar-se quan un trencament té lloc en un cromosoma i aquest no es repara fent que es vegi en metafase com una delecció terminal acompanyada d'un fragment acèntric, o quan tinguin lloc dos trencaments en un mateix cromosoma i es puguin donar reorganitzacions intracromosòmiques que es coneixen com a inversió que són simètrics i com anell + fragment acèntric que són asimètrics.

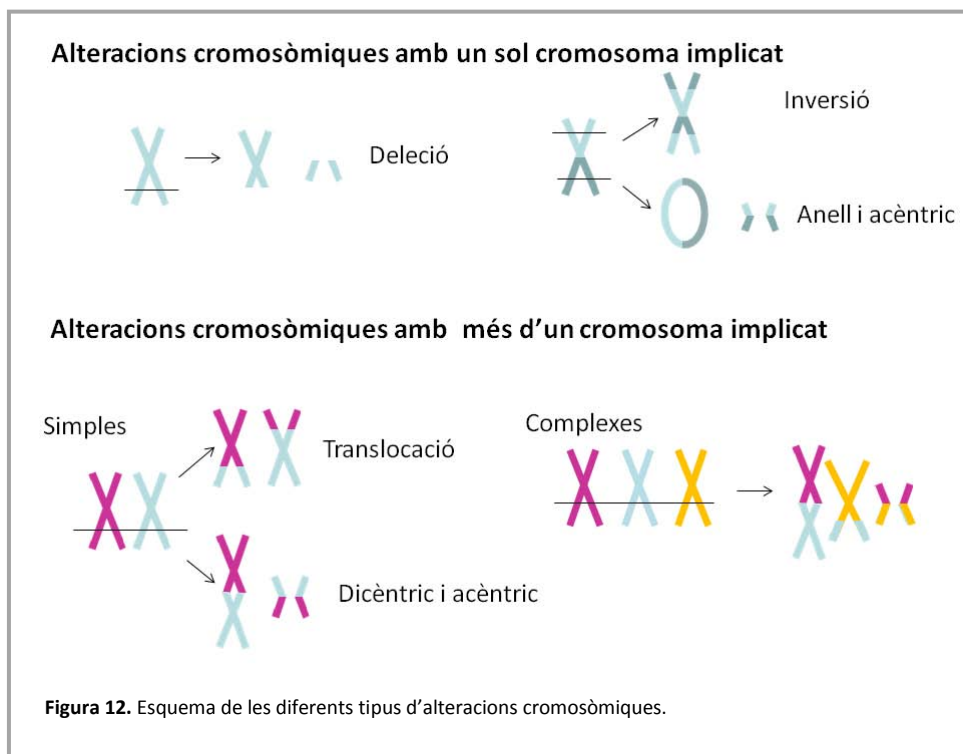
AC amb més d'un cromosoma implicat: En el cas que hi hagi intercanvi entre dos o més cromosomes les AC es poden classificar en alteracions completes quan totes les parts dels cromosomes estan reorganitzades i incompletes quan una o més parts no estan reorganitzades.

Quan es considera el nombre mínim de trencaments necessaris per produir una AC, es poden classificar en:

AC simples: Quan estan implicats dos trencaments. Poden donar lloc a reorganitzacions intercromosòmiques, en les que es poden produir intercanvis simètrics, quan la porció de cromosoma que porta el centròmer s'uneix al fragment acèntric distal d'un altre cromosoma. Aquest intercanvi s'anomena translocació. També es poden formar intercanvis asimètrics, quan les porcions del cromosoma que contenen el centròmer s'uneixen entre si formant un cromosoma dicèntric i els fragments acèntrics s'uneixen entre ells. Les AC simètriques són estables ja que es poden segregar en la divisió cel·lular i per tant, es mantenen en successives divisions, mentre que les AC asimètriques són inestables ja que presenten problemes de segregació en la divisió cel·lular, per tant, al llarg del temps es perden.

AC complexes: Quan el nombre mínim de trencaments implicats és de tres, i afecten a dos o més cromosomes.

A la Figura 12 es poden veure els esquemes de la formació dels diferents tipus d'AC.



1.2. Protecció radiològica

A partir del descobriment dels isòtops radioactius i els raigs X, a finals del segle XIX, es va posar de manifest la utilitat i els beneficis que el seu ús podia generar en el camp de la medicina. No obstant, en paral·lel es van anar posant de manifest els seus efectes nocius per la salut i per tant la necessitat d'establir mesures per assegurar un nivell adequat de protecció. Això va donar origen a la Protecció Radiològica (PR).

L'objectiu principal de la PR és assegurar que no s'adopti cap pràctica amb RI a menys que aporti un benefici net i positiu, que les exposicions necessàries es mantinguin a dosis tan baixes com sigui possible, i que les dosis rebudes pels individus no excedeixin els nivells establerts per a cada ús. Els individus ocupacionalment (professionalment) exposats, estan sotmesos a una legislació

que determina els nivells màxims d'exposició anuals (RDL 783/2001, de 6 de juliol). Per assegurar el compliment de les mesures de protecció, aquests individus porten dosímetres físics que enregistren els seus nivells d'exposició. Malgrat això, amb l'experiència de molts accidents radiològics molts laboratoris i organismes com la IAEA van veure necessari implementar sistemes d'estimació de la dosi rebuda utilitzant paràmetres biològics. Ja fos per confirmar la lectura del dosímetre físic o bé perquè no existia, o el valor era dubtós.

1.3. Dosimetria biològica

1.3.1 Definició i metodologies utilitzades

La dosimetria biològica permet l'estimació de la dosi d'una exposició a RI mitjançant l'anàlisi de biomarcadors. Entre els diferents biomarcadors que permeten l'estimació de la dosi, el recompte de cromosomes dicèntrics en metafases de limfòcits de sang perifèrica, és el més acurat i per tant el més universalment acceptat (IAEA, 2011). Els dicèntrics són un tipus d'alteració cromosòmica molt específica de les RI que es troben en una freqüència molt baixa en individus no exposats (1-2 dicèntrics en 1000 metafases). A més, la freqüència de dicèntrics induïts per les RI presenta una molt bona relació amb la dosi rebuda. Els limfòcits circulants són cèl·lules diferenciades que es troben en estat quiescent, i per tant per poder analitzar metafases s'han d'estimular amb un mitògen com pot ésser la fitohematoglutina. La freqüència de cromosomes dicèntrics comença a decaure 6 mesos després que hagi tingut lloc la exposició perquè és un tipus de AC inestable mitòticament.

Amb la mateixa freqüència que s'indueixen els dicèntrics s'indueixen les translocacions, i per tant també mostren una bona relació amb la dosi. Les translocacions cromosòmiques mostren una freqüència més constant amb el temps postirradiació perquè són més estables i són la millor eina per estimar

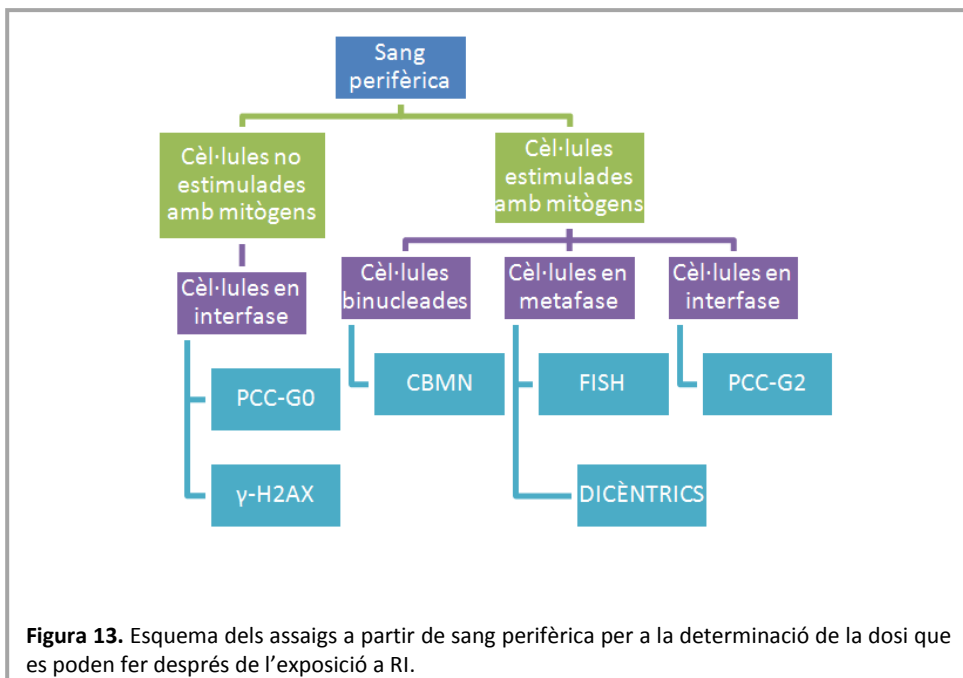
dosis d'exposicions retrospectives o cròniques a RI. El problema que presenta l'estudi d'aquest tipus de AC és que la seva freqüència incrementa amb l'edat (Sigurdson et al., 2008).

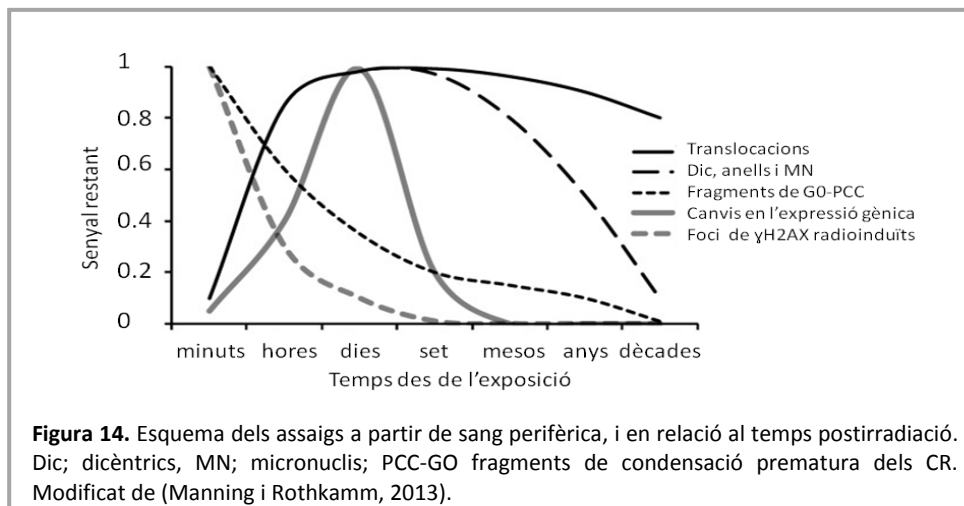
Com a biomarcador d'exposició a les RI també es poden analitzar els micronuclis (assaig de "cytokinesis-block micronucleus" CBMN). Aquests es formen a partir de fragments acèntrics o de cromosomes dicèntrics, anells, etc., que presenten problemes de segregació i que no són capaços d'incorporar-se al nucli de les cèl·lules filles durant la mitosi (Fenech, 2007). Igual que els dicèntrics, la freqüència dels micronuclis decau amb el temps després de l'exposició.

Un altre biomarcador, són els foci de la histona H2AX fosforilada que representen trencaments de doble cadena del DNA induïts per les RI. La fosforilació de la histona H2AX es pot detectar per immunofluorescència i és útil per detectar exposicions durant les primeres 24 h postirradiació, període en que la freqüència de foci mostra una relació amb la dosi. S'ha observat que el pic màxim de foci es dona entre 30 minuts i 1 h després de l'exposició a RI (Rothkamm et al., 2007; Roch-Lefèvre et al., 2010; Horn et al., 2011).

Quan les cèl·lules s'exposen a altes dosis de RI (superiors a 5 Gy), l'enlentiment o fins i tot el bloqueig en la progressió del cicle cel·lular impedeix o dificulta molt l'obtenció de cèl·lules en metafase per poder analitzar les AC radioinduídes. En aquests casos s'ha proposat la utilització de la tècnica de condensació prematura dels cromosomes (PCC). Aquesta metodologia es pot realitzar sense necessitat d'estimular els limfòcits, mitjançant la fusió de les cèl·lules exposades a RI amb cèl·lules mitòtiques d'ovari de hamster xinès (CHO) (Pantelias i Maillie, 1983), permetent l'anàlisi dels cromosomes de cèl·lules en G0 (PCC-G0). La PCC també es pot induir en limfòcits estimulats, mitjançant l'addició de Caliculina-A o àcid Okadaïc als cultius. Aquests agents inhibeixen les proteïnes fosfatases 1 i 2A (PP1 i PP2A), que activen la fosfatasa Cdc25 i el factor promotor de la maduració

(MPF). Això provoca la condensació de cromosomes, la desaparició de l'embolcall nuclear i la formació del fus mitòtic permetent l'anàlisi dels cromosomes en cèl·lules a la fase G2 del cycle cel·lular (PCC-G2). (Kanda et al., 1999; Gotoh et al., 2005; Balakrishnan et al., 2010; Puig et al., 2013; Romero et al., 2013). Amb la PCC es pot realitzar el recompte de peces cromosòmiques, de manera que es poden comptabilitzar els fragments cromosòmics extra produïts per l'efecte de les RI, que mostren una clara relació amb la dosi. Si s'aplica la tècnica de FISH (*fluorescent in situ hybridization*) amb sondes centromèriques també es pot realitzar l'anàlisi de dicèntrics (Rodríguez et al., 2009)(Figures 13 i 14).





1.3.2 Corbes dosi-efecte per cromosomes dicèntrics

Per estimar la dosi rebuda, amb qualsevol biomarcador és necessari elaborar corbes de calibració dosi-efecte amb irradiacions *in vitro*. Això assumeix que una determinada dosi d'un determinat tipus de radiació produeix el mateix dany *in vivo* i *in vitro*, i que per tant la freqüència de dicèntrics observada en una determinada mostra pot ser extrapolada a una corba dosi-efecte (IAEA, 2011).

Per a l'elaboració de les corbes dosi-efecte és important que les condicions *in vitro* siguin el màxim de similars a les que tenen lloc *in vivo*. En el cas de cromosomes dicèntrics s'utilitzen mostres de sang perifèrica que es mantenen a 37 °C durant la irradiació i fins a 2 h després, per tal de que els mecanismes de reparació actuïn. A partir d'aquest moment la sang es cultiva com es faria amb una mostra d'una persona que es sospita que ha estat exposada a RI.

Per a la formació d'un dicèntric, el dany al DNA produït en dos cromosomes diferents es repara il·legítimament unint extrems de forma errònia. Els danys en els dos cromosomes a més han d'estar propers en l'espai i temps, en

l'anomenada "distància de reunió", que no supera 1 μm . Amb radiacions d'alta LET, el nombre de ionitzacions per unitat de recorregut és elevat i els dicèntrics es produeixen bàsicament per una sola traça. Això fa que per a radiacions d'alta LET la relació dosi-efecte per cromosomes dicèntrics tendeixi a seguir un model lineal (Preston, 1990) (equació 1) (Figura 15A).

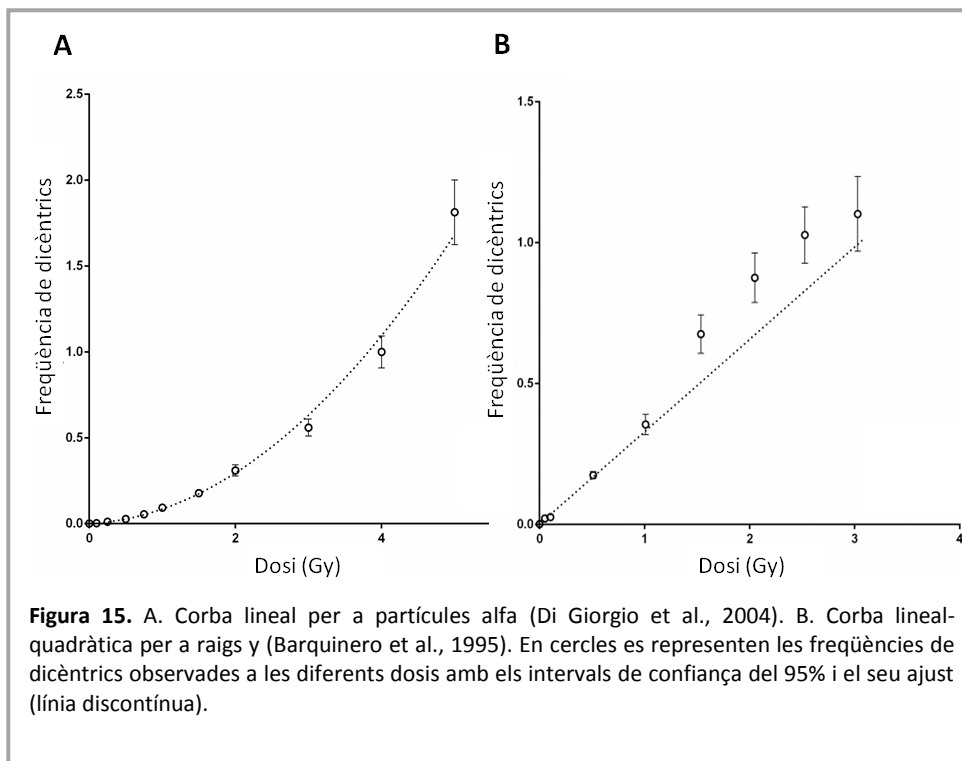
$$Y=C+\alpha D \quad (1)$$

On Y és la freqüència de dicèntrics observada després de una dosi D de radiació, C és la freqüència de dicèntrics basal i α el coeficient lineal.

Les radiacions de baixa LET, produeixen poques ionitzacions per unitat de recorregut, i per tant, la probabilitat de que els trencaments dels dos cromosomes implicats sigui provocada per la mateixa traça és baixa. És més probable que els dos trencaments necessaris per la formació d'un dicèntric es produeixin per dues traces diferents, en aquest cas, els dicèntrics formats per dues traces es representen per un component quadràtic, mentre que els que es formen per la interacció d'una única traça es representen per un component lineal. Per tant, la relació dosi-efecte segueix un model lineal-quadràtic (Lea i Catchside, 1942)(equació 2) (Figura 15B).

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

On Y és la freqüència de dicèntrics observada després de una dosi D de radiació, C és la freqüència de dicèntrics basal i α i β els coeficients lineal i lineal-quadràtic respectivament.



Empíricament s'ha demostrat que la distribució de dicèntrics en les cèl·lules, després d'una irradiació homogènia a radiacions de baixa LET, s'ajusta a una distribució de Poisson (Edwards et al., 1979). Per comprovar-ho, s'utilitza el test de la U, que és la unitat normalitzada de l'índex de dispersió (σ^2/y) (equació 3) (Rao i Chakravati, 1965; Savage, 1970).

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

On N són les cèl·lules analitzades i x al número de dicèntrics.

Els valors entre ± 1.96 indiquen que la distribució de dicèntrics segueix una distribució de Poisson amb un nivell de significança de $\alpha=0.05$. La distribució de dicèntrics s'ajusta a un model lineal o lineal-quadràtic, depenent del tipus de radiació, mitjançant el mètode de màxima versemblança.

La bondat de l'ajust i la significança dels coeficients ha de ser testada. Per fer-ho s'utilitzen, la proba de Chi^2 per comprovar la diferència entre la freqüència de dicèntrics observada i l'esperada pel model, i la proba F per testar la significança de l'ajust dels coeficients obtinguts.

1.3.2.1. Estimació de la dosi rebuda en casos d'exposició a RI total i homogeneïtat

Per estimar la dosi de radiació rebuda després d'una exposició total i homogeneïtat, la freqüència de dicèntrics de la mostra analitzada s'extrapola a la corba dosi-efecte elaborada prèviament per cada laboratori. Pel càlcul de la incertesa de la dosi estimada, i per donar un interval de confiança del 95%, que tingui en compte l'error de la mesura i el de la corba, s'utilitza l'aproximació de Merkle (Merkle, 1983). Els càlculs de les dosis D_L i D_U (límit inferior, D_L i límit superior, D_U , de l'interval confiança del 95%) es realitzen mitjançant iteració o a partir de la intersecció entre Y_L i Y_U (límit inferior de la freqüència de dicèntrics, Y_L i límit superior de la freqüència de dicèntrics, Y_U , de l'interval confiança del 95%) i l'interval inferior i superior de la corba (Figura 16).

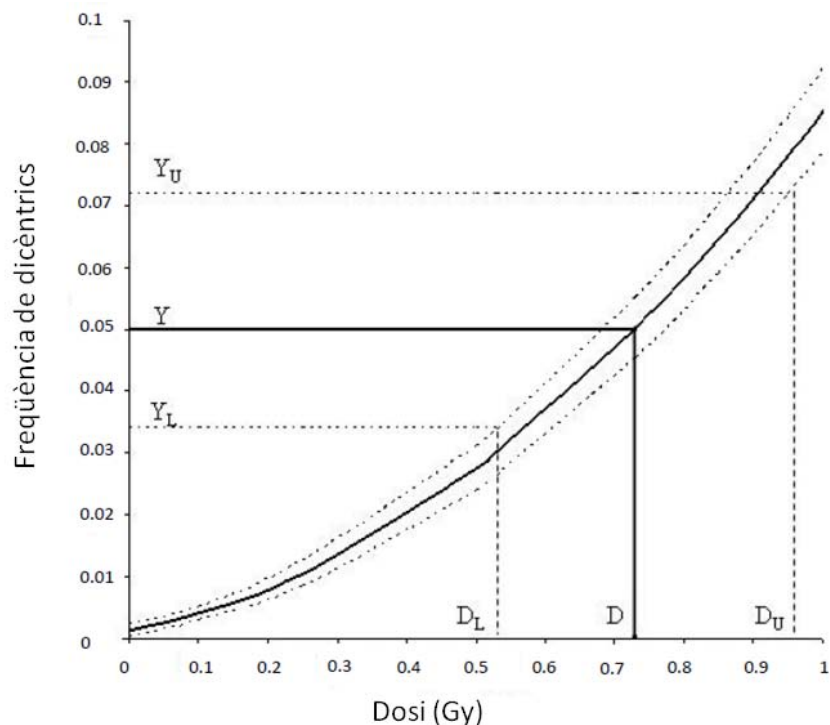


Figura 16. Corba dosi-efecte on es pot veure l'extrapolació de la freqüència de dicèntrics observada (Y) a la dosi obtinguda (D) amb els intervals de confiança del 95% (Y_L i Y_U) i (D_L i D_U). Modificat de IAEA (2011).

1.3.2.2. Estimació de la dosi rebuda en casos d'exposicions no homogènies

En casos d'accidents reals l'exposició homogènia de tot el cos té lloc poques vegades, generalment el que passa és que les diferents parts del cos reben dosis diferents. Per això s'han desenvolupat metodologies que permeten l'estimació de la dosi en escenaris més complexos, com són el casos d'exposicions parcials, que consideren situacions on només una part del cos ha estat exposada i ha estat exposada homogèniament.

En el cas de les irradiacions parcials, la distribució de dicèntrics s'allunya de la Poisson, a mida que augmenta la proporció de sang no irradiada, observant-se sobredispersió. Això és degut a que en la categoria de cèl·lules sense dicèntrics, hi ha cèl·lules que provenen tant de la fracció irradiada com de la no irradiada, de manera que la distribució queda "inflada" en aquesta categoria (*zero inflated Poisson*). En alguns casos però, la sobredispersió no és detectable, sobretot quan la fracció del cos irradiada és molt gran. En aquests casos, si es sospita que ha tingut lloc una irradiació parcial, la comparació entre els resultats obtinguts, estimant la dosi considerant l'exposició tant com a total, com a parcial, es proposa considerar la dosi estimada més elevada (Barquinero et al., 1997).

Quan la distribució de les cèl·lules amb dicèntrics mostra una sobredispersió, és a dir hi ha hagut una exposició parcial, existeixen dos mètodes pel càlcul de la dosi: El primer mètode, proposat per Dolphin (Dolphin, 1969), assumeix que hi ha una fracció del cos que ha estat irradiada i una altre que no ho ha estat i considera que les cèl·lules sense dicèntrics provenen tant de la fracció que no ha estat exposada com de la fracció que ha estat exposada. La freqüència de dicèntrics en la fracció exposada es pot obtenir utilitzant l'equació 4:

$$\frac{X}{N-n_0} = \frac{Y_F}{1-e^{-Y}} \quad (4)$$

Y_F és la freqüència de dicèntrics a la fracció irradiada

e^{-Y} representa el número de cèl·lules no danyades en la fracció irradiada

X és el número de dicèntrics observats

N és el número total de cèl·lules analitzades

n_0 és el número de cèl·lules sense dicèntrics

El segon mètode, proposat per Sasaki i Miyata (1968), i anomenat Qdr, segueix la mateixa aproximació feta per Dolphin, però considera també, a part dels dicèntrics, els anells i els fragments acèntrics extra.

A partir de les freqüència de dicèntrics de la fracció irradiada, es pot obtenir la dosi interpolant a la corba dosi-efecte elaborada prèviament. També es pot calcular la D_L i D_U a partir de les freqüències obtingudes del càlcul de la Y_L i Y_U , aquest valors es poden obtenir de la mateixa manera que amb la irradiació total i homogènies mitjançant l'aproximació de Merkle (1983).

A partir de la freqüència de dicèntrics de la fracció irradiada també es pot calcular la fracció de cèl·lules analitzades que han estat irradiades (f) (equació 5).

$$Y_F f = \frac{X}{N} \quad (5)$$

Quan ha tingut lloc una exposició no uniforme, a part de la dosi rebuda també és important calcular la fracció del cos que ha estat irradiada (F), aquesta es calcula a partir de f aplicant correccions per tenir en compte la mort cel·lular en interfase i l'avantatge que tenen les cèl·lules no irradiades respecte les irradiades per arribar a metafase (equació 6).

$$F = \frac{f/p}{1-f+f/p} \quad (6)$$

On el valor de p es calcula mitjançant l'equació 7:

$$p = e^{-D/D_0} \quad (7)$$

On:

D és la dosi estimada i D_0 és la dosi a la qual el 37% del limfòcits arriben a metafase.

1.3.2.3. Estimació de la dosi després d'exposicions a altes dosis de radiació

La majoria de corbes dosi-efecte establertes fins el moment, arriben fins a dosis de 4-5 Gy. Això es deu a que el número de cèl·lules que arriben a metafase es redueix molt a mesura que la dosi de radiació augmenta.

Per a realitzar una estimació de la dosi, el més correcte és considerar les freqüències de dicèntrics que es trobin dins les del ventall de la corba prèviament elaborada.

Per tal d'obtenir més metafases i poder estimar dosis més altes de 5 Gy, s'han desenvolupat diverses metodologies, basades en mitigar el retard mitòtic que presenten les cèl·lules irradiades i evitar les restriccions que tenen les cèl·lules danyades per progressar pels *checkpoints* del cicle cel·lular.

Una opció consisteix en allargar els temps de cultiu, doncs s'ha descrit que existeix un retard en la progressió del cicle cel·lular d'aproximadament una hora per Gy de radiació (Purrott et al., 1980). Per tant, allargant el temps de cultiu, s'incrementa el nombre de cèl·lules que poden arribar a metafase i ser analitzades (Heimers et al., 2005; Yao et al., 2010; Chen et al., 2011; Vinnikov et al., 2013).

Anteriorment ja s'ha mencionat que la metodologia de condensació prematura de cromosomes PCC permet analitzar el nombre de peces cromosòmiques extra, però la relació dosi-efecte no és tan acurada, a dosis fins a 5 Gy, com l'anàlisi de dicèntrics (Pantelias i Maillie, 1983; Durante et al. 1999; Kanda et al., 1999; Gotoh et al., 2005; Rodríguez et al., 2009; Balakrishnan et al., 2010; Puig et al., 2013; Romero et al., 2013). Mitjançant aquesta tècnica, amb tinció uniforme no es poden analitzar dicèntrics, ja que els cromosomes prematurament

condensats no presenten constricció centromèrica, i per tant les corbes dosi-efecte es realitzen mitjançant el recompte de peces cromosòmiques extra o anells.

Una altre mètode per poder analitzar dicèntrics en un nombre elevat de metafases és inhibint el *checkpoint* G2/M. Això es pot realitzar mitjançant l'adició de cafeïna al final del cultiu, permetent que cèl·lules danyades puguin arribar a metafase (Rowley et al., 1984; Sarkaria et al., 1999; Terzoudi et al., 2009). Un estudi preliminar, realitzat al nostre laboratori, utilitzant cafeïna per l'anàlisi de dicèntrics després de dosis molt elevades de RI, va mostrar que els cultius tractats amb cafeïna presentaven un índex mitòtic superior als cultius que només havien estat tractats amb colcemid, demostrant el seu potencial en dosimetria biològica després de altes dosis de radiació. (Pujol et al., 2012)(annex 1). La cafeïna inhibeix l'activitat catalítica d'ATM i ATR per tant el *checkpoint* G2/M, permetent que cèl·lules amb moltes anomalies cromosòmiques puguin arribar a metafase (Figura 17).

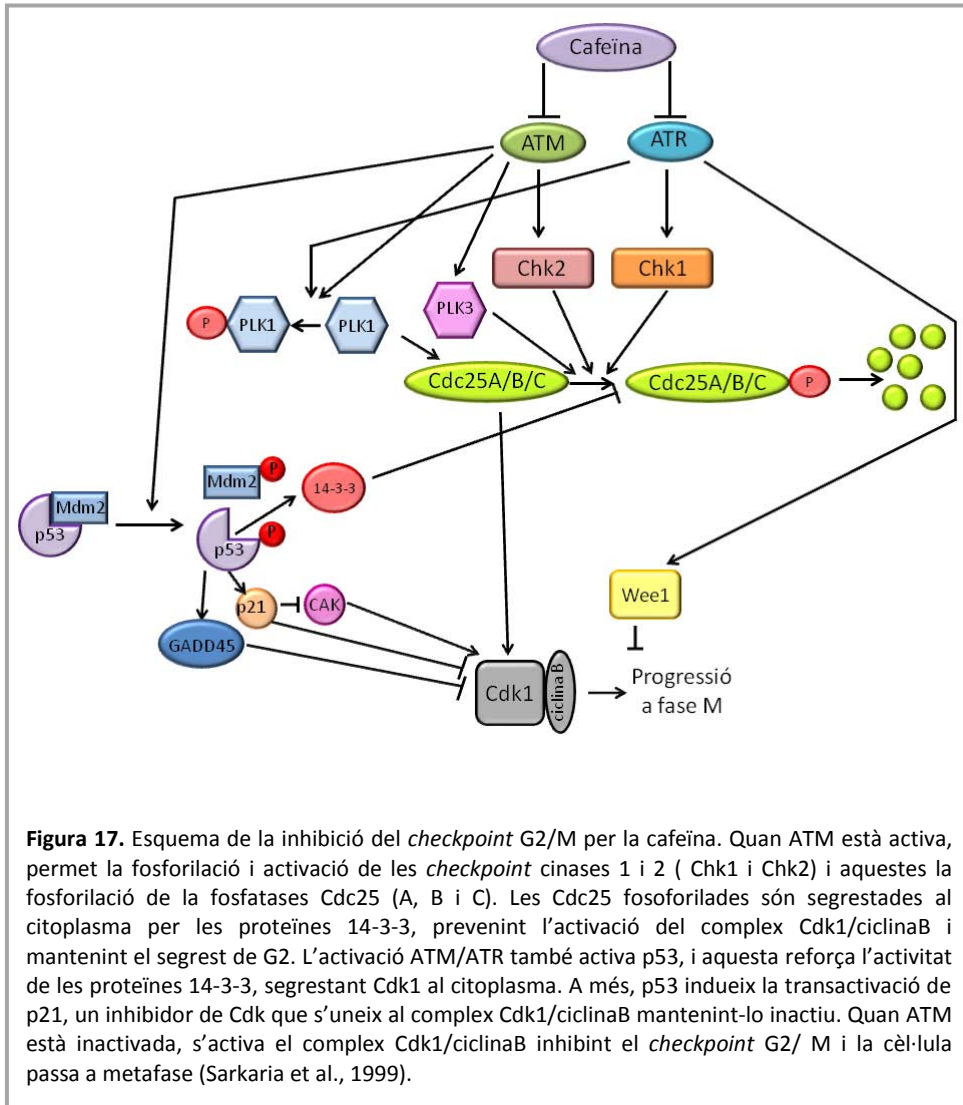


Figura 17. Esquema de la inhibició del *checkpoint* G2/M per la cafeïna. Quan ATM està activa, permet la fosforilació i activació de les *checkpoint* cinases 1 i 2 (Chk1 i Chk2) i aquestes la fosforilació de la fosfatases Cdc25 (A, B i C). Les Cdc25 fosforilades són segrestades al citoplasma per les proteïnes 14-3-3, prevenint l'activació del complex Cdk1/ciclinaB i mantenint el segrest de G2. L'activació ATM/ATR també activa p53, i aquesta reforça l'activitat de les proteïnes 14-3-3, segrestant Cdk1 al citoplasma. A més, p53 induïx la transactivació de p21, un inhibidor de Cdk que s'uneix al complex Cdk1/ciclinaB mantenint-lo inactiu. Quan ATM està inactivada, s'activa el complex Cdk1/ciclinaB inhibint el *checkpoint* G2/ M i la cèl·lula passa a metafase (Sarkaria et al., 1999).

2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral és el desenvolupament d'una metodologia de dosimetria biològica que sigui útil per casos d'exposicions a dosis molt elevades (més de 5 Gy) de RI, tan per exposicions homogènies com no homogènies.

Aquest objectiu es concreta en els següents:

1. Elaboració d'una corba dosi-efecte per a estimar exposicions a dosis molt elevades de RI

- 1.1. Optimització del cultiu de limfòcits amb cafeïna per a l'anàlisi citogenètica.
- 1.2. Elaboració d'una corba dosi-efecte mitjançant l'anàlisi de cromosomes dicèntrics a dosis entre 0 i 25 Gy.
- 1.3. Validació de la corba simulant irradiacions totals i parcials.

2. Desenvolupament d'una nova metodologia d'estimació de dosi per irradiacions no homogènies i dosis elevades de RI

- 2.1. Avaluar la possibilitat de distingir dues poblacions de limfòcits irradiades a diferents dosis.
- 2.2. Validació de la metodologia comparant els resultats estimats amb els reals.

3. RESULTATS

TREBALL 1.

Pujol, M., Barquinero, J. F., Puig, P., Puig, R., Caballín, M. R., Barrios L. (2014). **A new model of biodosimetry to integrate low and high doses.** *PLoS One*, 9:e114137

TREBALL 2.

Pujol, M., Barrios, L., Puig, P., Caballín, M. R., Barquinero, J. F. **A new model for biological dose-assessment in cases of heterogeneous exposures to ionizing radiation.** *Radiation Research*. DOI: 10.1667/RR14145.1

4. DISCUSSIÓ

4.1. Corbes dosi-efecte per a estimar exposicions a dosis molt elevades de RI

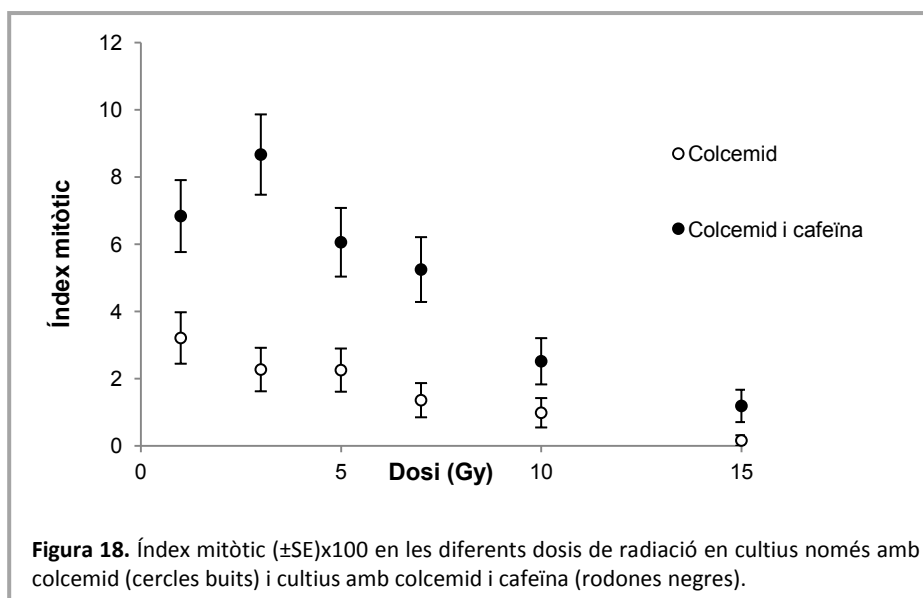
4.1.1. Optimització del cultiu de limfòcits amb cafeïna per a l'anàlisi citogenètica

En els anys 70 es va fer el primer estudi *in vitro* per estimar la dosi en casos d'irradiacions parcials (Lloyd et al., 1973). En aquest estudi es van fer cultius on es barrejava sang irradiada i no irradiada a la mateixa proporció. Es va observar que el número de metafases corresponents a la fracció irradiada era menor que el de les corresponents a la fracció no irradiada. Aquest mateix grup, el 1977 va estudiar el retard mitòtic observat en les cèl·lules irradiades, comparant la proporció de cèl·lules de les dues fraccions (irradiada i no irradiada) en cultius de diferent durada, mostrant que aquest retard augmentava amb la dosi de radiació (Lloyd et al., 1977). El retard en la progressió del cicle cel·lular està relacionat amb la dificultat que tenen les cèl·lules amb el material genètic molt danyat per superar els *checkpoints*.

La incorporació de cafeïna al final del cultiu inhibeix el *checkpoint* G2/M mitjançant la inhibició d'ATM i per tant permet que les cèl·lules en G2 que no superarien el *checkpoint* G2/M, siguin analitzades en metafase (Kihlman et al., 1982; Lau i Pardee, 1982; Lücke-Huhle et al., 1983). És per això que la combinació del tractament amb cafeïna i l'allargament del temps de cultiu incrementa l'índex mitòtic en mostres de sang irradiades en G0 (Tanzarella et al., 1986).

El potencial del tractament dels cultius amb cafeïna després d'irradiacions a altes dosis per a la seva aplicació en dosimetria biològica no es va estudiar fins el 2012. En un estudi preliminar realitzat al nostre laboratori (Pujol et al.,

2012) (annex 1), vàrem observar que la freqüència de dicèntrics, en els cultius tractats amb cafeïna, no es modificava significativament respecte als cultius tractats només amb colcemid, mentre que l'índex mitòtic augmentava (Figura 18). En aquest estudi també es va descriure que allargant el temps de cultiu de les mostres irradiades a 15 Gy fins a 60 h, l'índex mitòtic augmentava molt, però la freqüència de dicèntrics disminuïa respecte la observada en cultius de 48 h (de 10.57 ± 0.46 dicèntrics per cèl·lula en els cultius de 48h a 6.65 ± 0.24 en els de 60 h). Aquests resultats mostraven que l'addició de cafeïna als cultius de 48 h no modificava la freqüència de dicèntrics però facilitava l'anàlisi després d'irradiacions a altes dosis, mentre que l'allargament del temps de cultiu fins a 60 h sí que disminuïa la freqüència de dicèntrics.



En el primer objectiu de la present tesi es va proposar l'elaboració d'una corba dosi-efecte que inclogués dosis de irradiació baixes, mitges i altes utilitzant cultius amb cafeïna. Per això, el primer pas va ser optimitzar la durada dels cultius amb cafeïna considerant dos paràmetres, primer que la prolongació del cultiu no afectés la freqüència de dicèntrics i segon la

obtenció d'un índex mitòtic que permetés obtenir un número suficient de metafases a dosis elevades. Aquesta optimització es va fer cultivant sang irradiada a 10 Gy de raigs γ a diferents temps entre 48 i 72 h. Aquesta dosi es va seleccionar perquè es trobava aproximadament a la meitat de les dosis que es volien utilitzar per la posterior elaboració de la corba dosi-efecte. A partir de les 50 h de cultiu es va observar un lleuger descens de la freqüència de dicèntrics mentre que l'índex mitòtic anava augmentant. Aquest descens progressiu de la freqüència de dicèntrics es va fer més evident, a partir de les 57 h de cultiu, i podria estar relacionat amb l'eliminació per apoptosi en interfase de cèl·lules portadores de dicèntrics (Belloni et al., 2008). Per altra banda, si sense irradiar el pic de cèl·lules en metafase es dona a les 48 h de cultiu i per cada Gy aquest pic es retarda 1 h (Purrott et al., 1980), explicaria que després de 10 Gy trobéssim un pic de metafases a les 58 h de cultiu. Els resultats van mostrar que la millor combinació entre índex mitòtic i freqüència de dicèntrics es donava a les 57 h de cultiu. Per això, per realitzar la corba dosi-efecte es va seleccionar les 57 h de durada de cultiu amb cafeïna (Figura 1 treball 1).

4.1.2. Elaboració d'una corba dosi-efecte mitjançant el recompte de dicèntrics a dosis entre 0 i 25 Gy

Hi ha poques corbes dosi-efecte descrites on s'utilitzin dosis de més de 5 Gy degut a la dificultat d'obtenir metafases després d'una irradiació a altes dosis, i les que s'han fet s'han ajustat a un model lineal-quadràtic, malgrat la clara desviació entre la corba i les freqüències de dicèntrics, sobretot a les dosis més elevades (Chen et al., 2011; Vinnikov et al., 2013; Yao et al., 2013). Aquesta desviació, així com la obtenció de coeficients negatius de la corba, s'atribueixen a un efecte de saturació en la freqüència de dicèntrics després de molt altes dosis de RI (Hayata et al., 2001; Yao et al., 2010; Chen et al.,

2011). La saturació és en gran part deguda a que el nombre de cromosomes d'una cèl·lula és finit. Una cèl·lula somàtica humana té 46 cromosomes i per tant, teòricament com a màxim es podrien formar 23 cromosomes dicèntrics. En les corbes dosi-efecte elaborades amb dosis fins a 5 Gy aquest efecte de saturació no s'observa. Després d'irradiar a 5 Gy, la freqüència de dicèntrics està al voltant dels 2 dicèntrics per cèl·lula i les cèl·lules més danyades presenten com a molt 6-7 dicèntrics (Lloyd et al., 1973; Barquinero et al., 1995; Heimers et al., 2005; Pujol et al., 2012). En el treball 1 després d'una irradiació de 25 Gy, la freqüència de dicèntrics en el cultiu tractat amb cafeïna va ser de 10.65 dicèntrics/cèl·lula observant-se fins i tot 19 dicèntrics en una cèl·lula.

Per tal de millorar l'ajust de la corba dosi-efecte a molt altes dosis de radiació, Sasaki (2003), va proposar un model multiparamètric semiempíric. En aquest treball els paràmetres del model es van calcular en dos passos: En el primer, es va realitzar una aproximació al model lineal-quadràtic utilitzant els valors de la freqüència de dicèntrics obtinguts entre les dosis de 0.01 i 3 Gy. Després, mantenint els coeficients C, alfa i beta obtinguts en el primer pas, i utilitzant la freqüència de dicèntrics de tot el rang de dosis (fins als 50 Gy), es van estimar 4 paràmetres més, un dels quals era la constant de saturació determinada manualment. La utilització d'aquest model dona infraestimacions a les dosis més baixes, i per això l'autor va proposar la seva aplicació únicament per a l'estimació de dosis més grans de 3 Gy. És a dir, Sasaki (2003) va proposar l'ús de dues corbes per a l'estimació de la dosi, una ajustada al model lineal-quadràtic per a les dosis baixes i una altra, multiparamètrica, per a les dosis altes.

En moltes de les corbes dosi-efecte publicades, s'observa en algunes dosis sotadispersió (valors negatius de la U de Papworth) en la distribució de dicèntrics per cèl·lula, que en general no és significativa. Per això, s'associava

a un efecte de les altes dosis de radiació (Edwards et al., 1979; Yao et al., 2010; Pujol et al., 2012; Vinnikov et al., 2013) i malgrat que les desviacions s'observaven en la majoria d'estudis s'assumia que la distribució s'ajusta a una Poisson.

En els cultius tractats amb cafeïna es va observar que la sotadispersió incrementa en relació als cultius no tractats amb cafeïna (Pujol et al., 2012)(annex 1). En la corba dosi-efecte presentada al treball 1, s'observava sotadispersió a totes les dosis, essent significativa en 4 d'elles. Per això, en comparar les distribucions de dicèntrics observada i esperada, assumint una distribució de Poisson, es va detectar que a partir dels 5 Gy s'observaven menys cèl·lules sense o amb pocs dicèntrics de les que s'esperava (Figura 19). Una possible explicació a aquest fet està relacionada amb la reparació dels DSBs. S'ha descrit que la probabilitat de reunió dels fragments trencats depèn de la proximitat espacial i temporal (Kühne et al., 2000; Löbrich et al., 2000; Rothkamm et al., 2008). Per tant es pot suposar que hi ha un increment de unions errònies (unió de fragments que provenen de cromosomes diferents) a mida que la dosi de radiació augmenta, ja que a dosis altes hi ha més trencaments i per tant incrementa la probabilitat de reunió entre fragments de cromosomes diferents.

Per altra banda, a dosis altes també s'han observat menys cèl·lules amb molts dicèntrics de les que s'esperen en una distribució de Poisson. En aquest cas això és degut a la saturació en el nombre de dicèntrics descrita abans.

En el nostre estudi, s'han considerat, la saturació de la freqüència de dicèntrics i la sotadispersió, i s'ha fet l'ajust a una corba tipus Gompertz, que no s'havia aplicat abans en dosimetria biològica, assumint una distribució de Poisson ponderada (equació 8) on k és el número de dicèntrics, λ la

freqüència de dicèntrics i b el coeficient de ponderació que es va determinar empíricament a partir de la distribució de dicèntrics a les diferents dosis (d), de manera que es donava més pes a les cèl·lules amb més dicèntrics (equació 9). D'aquesta manera es va aconseguir un millor ajust entre les distribucions esperades i observades (Figura 19).

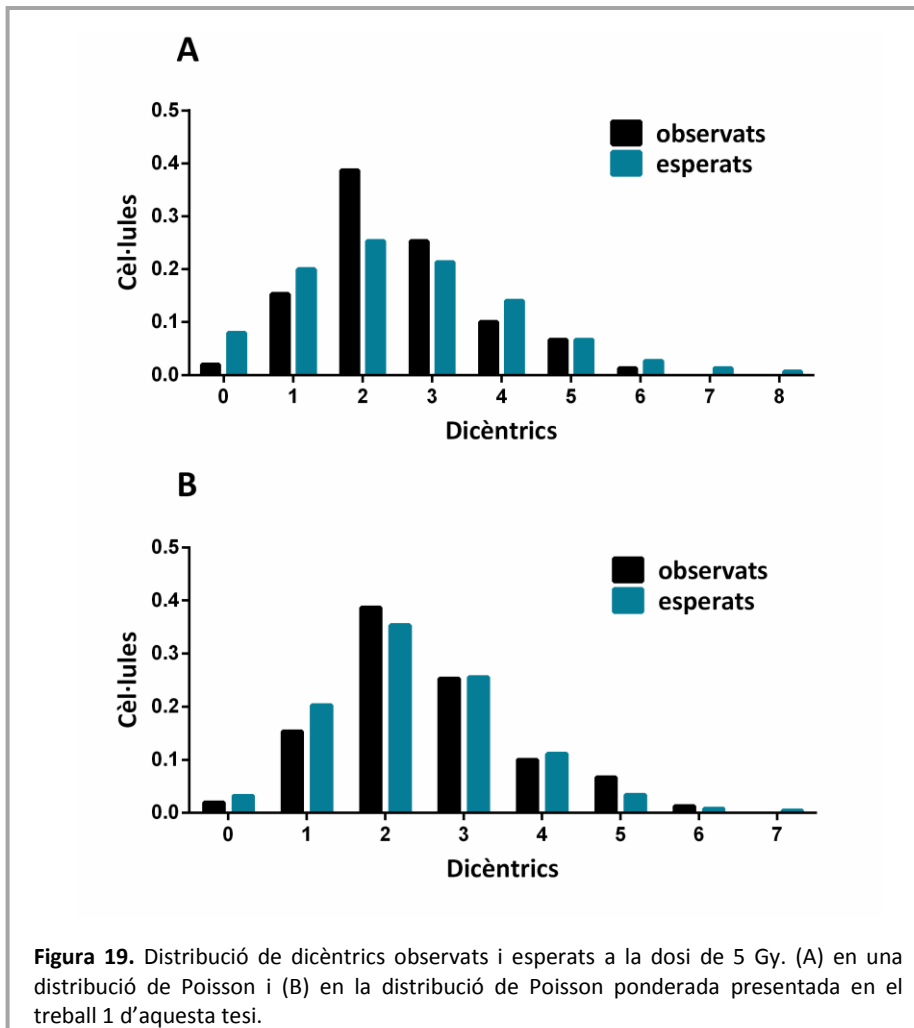


Figura 19. Distribució de dicèntrics observats i esperats a la dosi de 5 Gy. (A) en una distribució de Poisson i (B) en la distribució de Poisson ponderada presentada en el treball 1 d'aquesta tesi.

$$P(k; b, \lambda) = \frac{1 + bk^2}{1 + b(\lambda + \lambda^2)} \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}, k = 0, 1, 2, \dots \quad (8)$$

$$b(d) = \beta_3 d \quad (9)$$

Un dels objectius de la tesi era elaborar una corba dosi-efecte que fos aplicable tan a baixes com a altes dosis. En el primer treball d'aquesta tesi, per a l'elaboració de la corba (amb 11 dosis de 0 a 25 Gy), es proposa l'ajust de les freqüències a un model Gompertz (equació 10). Aquest model, s'ajusta a una funció quadràtica a baixes dosis, i té en compte la saturació de dicèntrics observada després de dosis molt altes de radiació, i considera que la freqüència de dicèntrics (λ) depèn de la dosi (d). Així mateix, és de destacar que el model proposat presenta menys coeficients que el model multiparamètric de Sasaki (2003). Tot i que es van observar desviacions en l'estimació de la dosi a les dosis més baixes, aquestes no tenen una tendència a infra o a sobreestimar la dosi rebuda.

$$\lambda(d) = \beta_0 e^{-\beta_1 e^{-\beta_2 d}} \quad (10)$$

4.1.3. Validació del nou model Gompertz de corba dosi-efecte per a altes dosis

En el treball 1, per comprovar que el millor ajust entre la corba i les dades experimentals s'obtenia amb el model Gompertz, les dades també es van ajustar als models lineal i lineal-quadràtic, en aquests casos assumint una distribució de Poisson (IAEA, 2011). Quan es va estudiar la bondat dels ajusts dels tres models es van obtenir uns valors de χ^2 de 875.31, 746.37 i 70.14 per l'ajust lineal, lineal-quadràtic i de Gompertz respectivament, indicant que el millor ajust s'obtenia amb el model Gompertz.

Per validar la corba dosi-efecte es van irradiar mostres de sang d'un donant, diferent a l'utilitzat per elaborar la corba, a les dosis de 2, 6, 12 i 17 Gy. Es va simular irradiació total a aquestes 4 dosis i a les dosis de 6 i 12 Gy també es van simular irradiacions parcials (del 30 i del 70% de sang irradiada). En la majoria de les simulacions es van obtenir millors resultats amb el model Gompertz, posant de manifest l'aplicabilitat d'aquest model en dosimetria biològica tan en casos d'irradiació total com parcial.

4.2. Desenvolupament d'una nova metodologia per l'estudi d'exposicions no homogènies a RI

En casos d'accidents radiològics, a dosis superiors als 4-5 Gy, si l'exposició ha estat total i homogènia, l'individu mostrarà característiques clíniques i biològiques, indicatives d'una sobreexposició a aquestes dosis de radiació. En canvi, en casos d'exposicions no homogènies aquestes característiques poden no ser tan evidents. En el manual de la IAEA (2011), quan la distribució de dicèntrics mostra sobredispersió ($U > 1.96$) s'indica que s'ha de considerar la irradiació com a parcial. És a dir, que hi ha una part del cos de l'individu que ha estat exposada a la radiació de manera uniforme i una altra que no ha estat exposada. En aquesta situació, per estimar la dosi de radiació rebuda a la part irradiada s'aplica, la metodologia de Dolphin (1969) o la de Qdr (Sasaki i Miyata, 1968) descrites anteriorment. No obstant, en la majoria dels accidents reals, les diferents parts del cos de l'individu exposat solen rebre un gradient de dosis (Sreedevi et al., 1993; Sevan'kaev et al., 1999; 2002; Liu et al., 2008; Balakrishnan et al., 2010), i per tant considerar que l'exposició ha estat parcial no és correcte. Amb l'objectiu de proposar una aproximació més acurada al que passa en la major part dels accidents, vam desenvolupar una nova metodologia experimental utilitzant mostres de sang de dues persones de sexe diferent (una dona i un home). Les seves sangs es

van barrejar per simular irradiacions parcials (sang d'un dels donants es va irradiar i l'altre no) o heterogènies (sang dels dos donants es van irradiar a dosis diferents). Al ser els donants de diferent sexe es va poder determinar a quin dels dos pertanyia cada metafase analitzada. A més dels cultius de colcemid, a les simulacions on s'havien utilitzat dosis més altes es van realitzar cultius co-tractats amb colcemid i cafeïna. En l'objectiu 2.1. d'aquesta tesi ens vam proposar avaluar l'efectivitat de la cafeïna en la mitigació del retard que presenten les cèl·lules irradiades per arribar a metafase en exposicions no homogènies (parcials i heterogènies). Per estudiar-ho, es van realitzar tres tipus de tractament dels cultius. En el primer tipus es van tractar els cultius seguint les recomanacions de la IAEA (2011) (cultiu de 48 h afegint colcemid les dues últimes hores). En els altres dos tipus de cultiu es va afegir colcemid a les 24 h des de l'inici, cafeïna a les 46 h i l'extracció dels cultius va tenir lloc a les 48 h i a les 57 h.

Els resultats del treball 2 van mostrar que la proporció de cèl·lules de la fracció irradiada a la dosi més alta augmentava en els cultius amb cafeïna, essent més significatiu en els cultius de 57 h. Després de 17 Gy només amb el cultiu de 57 h amb cafeïna es van poder analitzar suficients metafases de la fracció de sang irradiada per comptabilitzar 100 dicèntrics. Aquests resultats posen de manifest l'efectivitat del tractament amb cafeïna, no només per irradiacions totals sinó també per mitigar el retard que presenten les cèl·lules irradiades respecte les no irradiades o les que han estat irradiades a les dosis més baixes en exposicions heterogènies.

4.2.1. Valoració de la mixtura de Poissons per l'estimació de la freqüència de dicèntrics

El co-cultiu de sang de dos donants de sexe diferent va permetre comprovar l'efectivitat de la metodologia de mixtura de Poissons per analitzar la

distribució de dicèntrics, tan en simulacions d'exposicions parcials com en exposicions heterogènies. A partir d'aquest estudi proposem l'aplicació de la mixtura de Poissons quan es detecti sobredispersió en la distribució de dicèntrics ja que permet diferenciar dues distribucions de Poisson barrejades, com en el cas d'irradiacions heterogènies. En el segon treball s'ha utilitzat la mixtura de dues distribucions de Poisson, cadascuna d'elles amb una freqüència de dicèntrics diferent i amb diferent pes relatiu en el total de cèl·lules analitzades.

Quan té lloc una irradiació a una dosi x , si l'exposició ha estat homogènia la distribució de dicèntrics per cèl·lula s'ajusta a una distribució de Poisson, i la probabilitat d'observar un limfòcit amb k dicèntrics segueix l'expressió 11.

$$P(k; \lambda) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}, k = 0, 1, 2, \dots, \quad (11)$$

On λ representa la freqüència de dicèntrics a partir de la qual es calcula la dosi rebuda. No obstant, quan té lloc una exposició heterogènia en la que es reben dues dosis de radiació x_1 i x_2 , la distribució de dicèntrics segueix una mixtura de les dues distribucions de Poisson, amb la funció de probabilitat definida a l'equació 12.

$$P(k; \lambda_1, \lambda_2, \omega) = \omega \frac{\lambda_1^k e^{-\lambda_1}}{k!} + (1 - \omega) \frac{\lambda_2^k e^{-\lambda_2}}{k!}, k = 0, 1, 2, \dots \quad (12)$$

On λ_1 és la freqüència de dicèntrics a la dosi x_1 , λ_2 és la freqüència de dicèntrics a la dosi x_2 i ω , és un paràmetre entre 0 i 1, que representa la proporció de cèl·lules analitzades que han rebut la dosi x_1 . Així doncs, es pot assumir que $(1-\omega)$ és la proporció de cèl·lules analitzades que han rebut la dosi x_2 . Assumint que $x_1 > x_2$ i que conseqüentment $\lambda_1 > \lambda_2$. Cal assenyalar que quan $\lambda_2=0$ ($x_2=0$) l'expressió (12) esdevé la funció de probabilitat de la Poisson contaminada en el 0, que és el concepte en que es basa el mètode

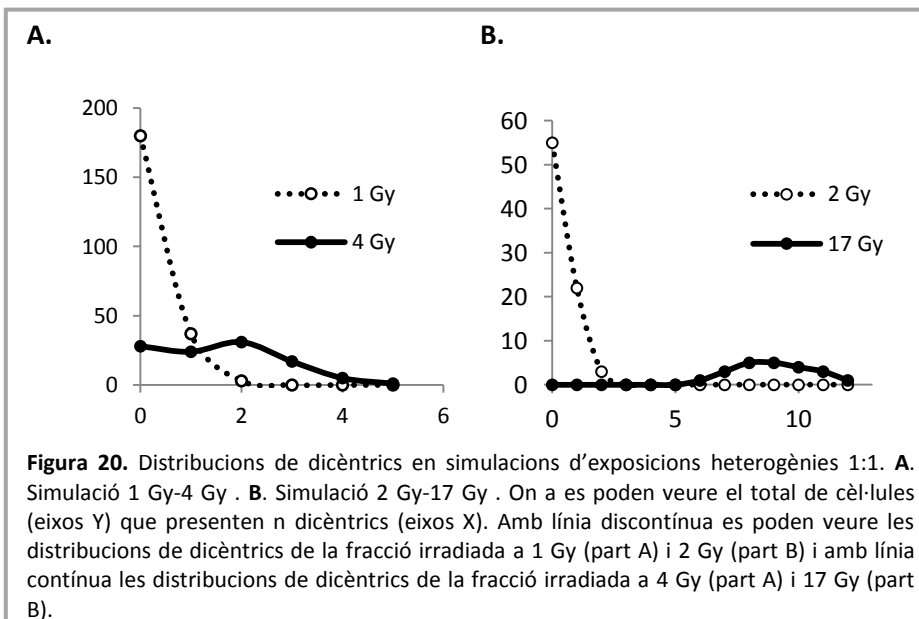
Dolphin (1969), i que en el nostre model seria un cas particular d'exposició no homogènia (equacions 13 i 14).

$$P(k = 0) = \pi + (1 - \pi)e^{-\lambda_1} \quad (13)$$

$$P(k = n) = (1 - \pi) \frac{\lambda^n e^{-\lambda}}{n!} \quad \text{per } n > 0 \quad (14)$$

On π és la proporció de cèl·lules sense dicèntrics que provenen de la fracció no irradiada.

En el nostre estudi quan es van comparar les freqüències de dicèntrics observades i les estimades mitjançant la mixtura de Poissons, es va observar que, per les simulacions d'irradiació parcial, en tots els casos, la freqüència observada i estimada era molt similar. Pel que fa a les simulacions d'exposicions heterogènies, mitjançant la mixtura de Poissons en pràcticament totes les simulacions es van distingir dues fraccions on la freqüència de dicèntrics era diferent a 0. Aquesta distinció era més clara quan les dues dosis eren més diferents, indicant la fiabilitat del model per ser utilitzat en irradiacions heterogènies (Figura 20).



4.2.2. Valoració de l'estimació de dosi en irradiacions no homogènies

Pel que fa a la simulació d'irradiacions parcials, les dosis estimades a partir de la mixtura de Poissons van ser molt similars a les dosis reals d'irradiació i, tal i com s'esperava, pràcticament idèntiques a les obtingudes mitjançant el mètode de Dolphin (1969).

En les simulacions d'exposicions heterogènies (irradiació a dues dosis diferents de 0), les dosis estimades aplicant la mixtura de Poissons, van ser diferents a zero i en la majoria dels casos els intervals de confiança incloïen les dosis reals d'irradiació. En canvi, quan l'estimació de la dosi es van fer a partir de les freqüències de dicèntrics calculades pel mètode de Dolphin (1969), només es va estimar una dosi diferent a zero en cadascuna de les simulacions, que sempre era similar a la dosi més elevada. La utilització del mètode de la mixtura de Poissons, permet estimacions de dosis similars a les obtingudes mitjançant mètode de Dolphin (1969) quan les irradiacions són parcials, però a més, permet l'estimació de les dosis acurada de més d'una dosi en els casos en que l'exposició ha estat heterogènia.

4.2.3. Valoració del càlcul de la fracció inicial de cèl·lules

irradiades a cada dosi

En casos d'exposició no homogènia, també és important determinar la fracció de cèl·lules irradiades en relació al total de cèl·lules analitzades. Amb la metodologia per determinar la fracció inicial de cèl·lules irradiades proposada al manual de la IAEA (2011), només es considera el cas d'irradiació parcial. Es pot calcular la fracció inicial de cèl·lules irradiades a partir de la proporció de cèl·lules analitzades de la fracció irradiada, aplicant

unes correccions per tenir en compte el retard que presenten les cèl·lules irradiades per arribar a metafase. Quan l'exposició ha estat heterogènia, l'estimació de la fracció inicial de cèl·lules irradiades amb aquesta metodologia no és correcta, ja que totes les cèl·lules han estat irradiades encara que a dosis diferents. Per casos d'exposicions heterogènies, en el treball 2 s'han afegit modificacions a l'equació proposada al manual de la IAEA (2011)(equació 6) per tal de considerar les fraccions inicials de cèl·lules irradiades a cada dosi. L'equació 15 permet determinar la fracció inicialment irradiada a la dosi més elevada F_1 .

$$F_1 = \frac{f_1}{f_1 + (1 - f_1)e^{\gamma(x_2 - x_1)}} \quad (15)$$

On f_1 correspon a la fracció de cèl·lules analitzades que ha estat irradiades a la dosi més alta i x_2 i x_1 són les dosis estimades a cadascuna de les dues fraccions. En aquestes exposicions heterogènies, x_2 i x_1 corresponen a les dosis més alta i més baixa respectivament. Per tant, quan l'exposició és parcial ($x_2=0$) l'equació $e^{\gamma(x_2 - x_1)}$ és conseqüentment igual a la publicada al manual de la IAEA (2011).

En aquesta equació, el coeficient γ és equivalent a l'invers de la constant D_0 , i D_0 representa la dosi a la qual el 37% dels limfòcits arriben a metafase. Per a aquest paràmetre, en cultius de 48 h amb colcemid s'han descrits valors de D_0 entre 2.7 i 3.8 (Sasaki i Miyata, 1968; Lloyd et al., 1973; Barquinero et al., 1997). Mitjançant les modificacions de la metodologia de Lloyd (1973) i Sasaki i Miyata (1968) proposades en el segon treball d'aquesta tesi, per als cultius amb colcemid és va obtenir un valor del coeficient γ de (0.371 ± 0.009) l'invers del qual és 2.7, igual al valor que va obtenir Lloyd (1973). Com que la D_0 depèn del tractament aplicat als cultius, si s'inhibeix el *checkpoint* G2/M amb cafeïna s'espera que la dosi a la qual arriben a metafase el 37% dels limfòcits sigui més alta. Per això que es van calcular valors de D_0 per als tres

tipus de tractament, en els cultius amb cafeïna els valors de D_0 de 3 i 5.5 pels cultius de 48 i 57 h respectivament. En els resultats obtinguts la majoria de les estimacions de la fracció inicialment irradiada a una dosi (F) es troben dins l'interval de $\pm 20\%$ de la fracció reals indicant la fiabilitat de la modificació aplicada.

5. CONCLUSIONS

1. En la optimització del cultiu de limfòcits , després d'una irradiació a 10 Gy de raigs γ , la millor relació entre índex mitòtic i freqüència de dicèntrics es va observar en els cultius tractats amb cafeïna i 57 h de durada.
2. El millor ajust de la corba dosi-efecte (de 0 a 25 Gy) es va obtenir amb el model Gompertz, que és aplicable a baixes, mitges i altes dosis de radiació. L'ajust amb aquest model, presenta menys desviacions que els models lineal i lineal-quadràtic i fins ara no s'havia aplicat en dosimetria biològica. El millor ajust es deu a que el model Gompertz considera tant la sotadispersió de la distribució de dicèntrics com la saturació de dicèntrics després de dosis molt elevades de radiació.
3. El nou model proposat s'ha validat experimentalment amb simulacions d'exposicions totals i parcials, posant-se de manifest la seva aplicabilitat en dosimetria biològica.
4. Mitjançant la realització de cultius de limfòcits amb una barreja de sang de dos individus de sexe diferent i irradiada a dosis diferents, es va poder comprovar que els resultats obtinguts utilitzant el model de mixtura de Poisson eren concordants amb els valors experimentals, indicant que és possible distingir dues distribucions de dicèntrics provinents d'irradiacions a dosis diferents.
5. L'aplicació del tractament amb cafeïna i la utilització del model de mixtura de Poissons, permet obtenir estimacions de dosi similars a les obtingudes mitjançant el mètode de Dolphin quan les irradiacions són parcials, però permet una millor estimació de la dosi rebuda en les simulacions d'exposicions heterogènies a dosis elevades.

6. En casos d'exposicions heterogènies, pel càlcul de la fracció inicial de cèl·lules irradiades a cada dosi, les modificacions matemàtiques proposades han permès determinar amb fiabilitat les dues fraccions.
7. Com a resum, podríem dir que les noves metodologies proposades en aquesta tesi representen un avenç molt important per poder estimar acuradament les dosis rebudes en la majoria d'accidents amb radiació ionitzant.

6. BIBLIOGRAFIA

A

- Abraham, R. T., & Tibbetts. R. S. (2005). Cell biology. Guiding ATM to broken DNA. *Science*. 308, 510-511.
- Ahnesorg, P., Smith P., & Jackson S. P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA non homologous end joining. *Cell*. 124, 301-313.

B

- Balakrishnan, S., Shirsath, K., Bhat, N., & Anjaria, K. (2010). Biodosimetry for high dose accidental exposures by drug induced premature chromosome condensation (PCC) assay. *Mutation Research*, 699(1-2), 11–6.
- Barquinero, J. F., Barrios, L., Caballín, M. R., Miró, R., Ribas, M., Subias, A. & Egozcue, J. (1995). Establishment and validation of a dose-effect curve for gamma-rays by cytogenetic analysis *Mutation Research*. 326, 65–69.
- Barquinero, J. F., Barrios, L., Caballín, M. R., Miró, R., Ribas, M., & Egozcue, J. (1997). Biological dosimetry in simulated *in vitro* partial irradiations. *International Journal of Radiation Biology*, 71(4), 435–440.
- Baumann P., Benson F. E. & West S. C. (1996). Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell*, 87, 757– 766.
- Belloni, A. P., Meschini, R., Lewinska, D., & Palitti, F. (2008). Apoptosis preferentially eliminates irradiated G0 human lymphocytes bearing dicentric chromosomes. *Radiation Research*, 169(2), 181–187.
- Boundless Biology. Control of the cell cycle. Access on 25/07/2015 <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/cell-reproduction-10/control-of-the-cell-cycle-89/regulator-molecules-of-the-cell-cycle-399-11626/>

Boutros, R., Dozier, C., & Ducommun, B. (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(2), 185–191.

Buscemi, G., Perego, P., Carenini, N., Nakanishi, M., Chessa, L., Chen, J., Delia, D. (2004). Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. *Oncogene*, 23(46), 7691–7700.

C

Caldecott, K. W. (2007). Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin. *DNA Repair*, 6(4), 443–453.

Chadwick, K.H. & Leenhouts, H. (1981). The molecular theory of radiation biology. *Monographs on theoretical and applied genetics*, vol.5. Springer. Berlín, Heidelberg, New York.

Chen, Y., Yan, X. K., Du, J., Wang, Z. D., Zhang, X. Q., Zeng, F. G., & Zhou, P. K. (2011). Biological dose estimation for accidental supra-high dose gamma-ray exposure. *Radiation Measurements*, 46(9), 837–841.

Ciccia A., Constantinou A. & West S. C. (2003). Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:25172-25178.

Couch, F. B., Bansbach, C. E., Driscoll, R., Luzwick, J. W., Glick, G. G., Bétous, R. (2013). ATR phosphorylates SMARCAL1 to prevent replication fork collapse. *Genes and Development*, 27(14), 1610–1623.

D

Daly, M. J. (2012). Death by protein damage in irradiated cells. *DNA Repair*, 11(1), 12–21.

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

- Defazio, L. G., Stansel, R. M., Grif, J. D., & Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 21, 3192-3200.
- Dolphin, G. W. (1969). Biological dosimetry with particular reference to chromosomal aberration analysis. A review of methods. *Handling of Radiation Accidents. Procedures International Symposium*. Vienna: International Atomic Energy Agency, 215–224.
- Dueva, R., & Iliakis, G. (2013). Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Translational Cancer Research*, 2(3), 163–177.
- Durante, M., Furusawa, Y., Majima, H., Kawata, T., Gotoh, E. (1999). Association between G2-phase block and repair of radiation-induced chromosome fragments in human lymphocytes, *Radiation Research*, 151, 670–676.

E

- Edwards, A. A., Lloyd, D. C., & Purrott, R. (1979). Radiation induced chromosome aberrations and the poisson distribution. *Radiation and Environmental Biophysics*, 16(2), 89–100.
- Edwards, A. A. (2002). Modelling radiation-induced chromosome aberrations. *International Journal of Radiation Biology*, 78(7), 551–558.
- España. Real Decreto-ley 783/2001, de 6 de julio, por el que se aprueba el reglamento sobre protección sanitaria contra radiaciones ionizantes. *Boletín oficial del estado*, 26 de julio de 2001, 178, 27284-27393.

F

- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084–1104.
- Fortini, P., & Dogliotti, E. (2007). Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair*, 6(4), 398–409.

G

- Georgakilas, A.G. (2008). Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge. *Molecular BioSystems*, 4, 30–35.
- Giorgio, M., Edwards, A. A., Moquet, J. E., Finnon, P., Hone, P. A, Lloyd, D. C., et al. (2004). Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by heavy charged particles in track segment mode. *Radiation Protection Dosimetry*, 108(1), 47–53.
- Gotoh, E., Tanno, Y., & Takakura, K. (2005). Simple biodosimetry method for use in cases of high-dose radiation exposure that scores the chromosome number of giemsa-stained drug-induced prematurely condensed chromosomes (PCC). *International Journal of Radiation Biology*, 81(1), 33–40.

H

- Hall, E. J., & Giaccia, A. J. (2006). Radiobiology for the radiologist. Sixth Edition, ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Hayata, I., Kanda, R., Minamihisamatsu, M., Furukawa, M., & Sasaki, M. S. (2001). Cytogenetical dose estimation for 3 severely exposed patients in the JCO criticality accident in Tokai-mura. *Journal of Radiation Research*, 42 Suppl, S149–155.
- Heimers, A., Brede, H. J., Giesen, U., & Hoffmann, W. (2005). Influence of mitotic delay on the results of biological dosimetry for high doses of ionizing radiation. *Radiation and Environmental Biophysics*, 44(3), 211–218.
- Holliday, R. (2007). A mechanism for gene conversion in *fungi*. *Genetic Research*, 89,285-307.
- Horn, S., Barnard, S., & Rothkamm, K. (2011). Gamma-H2AX-based dose estimation for whole and partial body radiation exposure. *PloS One*, 6(9), e25113.

I

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

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

Ip S. C., Rass U., & Blanco M. G. (2008). Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature*, 456, 357-61.

J

Johnson, R. D., & Jasin, M. (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *European Molecular Biology Organization*. 19, 3398-3407.

K

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

Kihlman, B., Hansson, K., Palitti, F., Andersson, H., & Hartley-Asp, B. (1982). Potentiation of induced chromatid-type aberrations by hydroxyurea and caffeine in G2. *Progress in Mutation Research* volume 4 (eds. Natarajan A. T. et al.) Elsevier Biomedical Press.

Kühne, M., Rothkamm, K., Löbrich, M. (2000). No dose-dependence of DNA double-strand break misrejoining following alpha-particle irradiation. *International Journal of Radiation Biology*, 76, 891–900.

L

- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G., & Taylor, S. S. (2012). The spindle assembly checkpoint. *Current Biology*, 22(22), R966–R980.
- Lau, C., & Pardee, A. (1982). Mechanism by which caffeine potentiates lethality of nitrogen mustard. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 79, 2942–2946.
- Lea, D., & Catheside, D. (1942). Induction by radiation chromosome aberrations in *Tradescantia*. *Journal of Genetics*, 44(2), 216-245.
- Lee, J., Kumagai, A., & Dunphy, W. G. (2001). Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 12(3), 551–563.
- Li, Y., Gorbea, C., Mahaffey, D., Rechsteiner, M., & Benezra, R. (1997). MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23), 12431–12436.
- Liu, Q., Jiang, B., Jiang, L.-P., Wu, Y., Wang, X.-G., Zhao, F.-L., *et al.* (2008). Clinical report of three cases of acute radiation sickness from a 60Co radiation accident in henan province in China. *Journal of Radiation Research*, 49(1), 63–69.
- Lloyd, D. C., Purrott, R. J., & Dolphin, G. W. (1973). Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation. *Physics in Medicine and Biology*, 18, 421–431.
- Lloyd, D. C., Dolphin, G. W., Purrott, R. J., & Tipper, P. A. (1977). The effect of X-ray induced mitotic delay on chromosome aberration yields in human lymphocytes. *Mutation Research*, 42(3), 401–412.
- Löbrich, M., Kühne, M., Wetzel, J., & Rothkamm, K. (2000). Joining of correct and incorrect DNA double-strand break ends in normal human and ataxia telangiectasia fibroblasts. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 27(1), 59–68.

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

M

Manning, G., & Rothkamm, K. (2013). Deoxyribonucleic acid damage-associated biomarkers of ionising radiation: current status and future relevance for radiology and radiotherapy. *The British Journal of Radiology*, 86, 20130173.

May, K.H., & Hardwich, K. G. (1999). The spindle checkpoint. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(1), 69–75.

Merkle, W. (1983). Statistical Methods in Regression and Calibration Analysis of Chromosome Aberration Data. *Radiation Environmental Biophysics*. 21:217–233.

N

Natarajan, A. T. (1984). Origin and significance of chromosomal alterations. *A: Mutations in Man*, ed. Obe, G. Springer-Verlag. Berlin. pp 156–176.

Natarajan, A. T., & Palitti, F. (2008). DNA repair and chromosomal alterations. *Mutation Research*, 657(1), 3–7.

P

Pantelias, G. E., & Maillie, H. D. (1983). A Simple Method for Premature Chromosome Condensation Induction in Primary Human and Rodent Cells Using Polyethylene Glycol. *Somatic Cells and Molecular Genetics*, 9(5), 533–547.

Paull, T. T., & Gellert, M. (1998). The 3' to 5' Exonuclease Activity of Mre11 Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Molecular Cell*, 1, 969–979.

- Poirier, M. G., Eroglu, S., & Marko, J. F. (2002). The bending rigidity of mitotic chromosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 13(6), 2170–2179.
- Polo, S. E., & Jackson, S. P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks : a focus on protein modifications. *Genes Development*, 25(5), 409–433.
- Preston, R. J (1990). Biological dosimetry: mechanistic concepts. I reunion internacional sobre dosimetría biológica. Lissie. Madrid. pp 21-34.
- Puig, R., Barrios, L., Pujol, M., Caballín, M. R., & Barquinero, J. F. (2013). Suitability of scoring PCC rings and fragments for dose assessment after high-dose exposures to ionizing radiation. *Mutation Research*, 757(1), 1–7.
- Pujol, M., Puig, R., Caballín, M. R., Barrios, L., & Barquinero, J. F. (2012). The use of caffeine to assess high dose exposures to ionising radiation by dicentric analysis. *Radiation Protection Dosimetry*, 149(4), 392–398.
- Purrott, R., Vulpis, N., & Lloyd, D. (1980). The use of harlequin staining to measure delay in the human lymphocyte cell cycle induced by in vitro X-irradiation. *Mutation Research*, 69(2), 275–282.

R

- Rao C.R. (1965). The theory of least squares when the parameters are stochastic and its application to the analysis of growth curves. *Biometrika*, 52(3), 447–458.
- Rass U., Compton S. A. & Matos J., (2010). Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. *Genes & Development*, 24, 1559-1569.
- Repetto, M., Semprine, J., and Boveris, A. (2012). Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. *Lipid peroxidation*. In: Catala A (ed) Croatia: In Tech.

- Revell, S. H. (1955). A new hypothesis for chromatid exchanges. *Proceedings of Radiobiology Symposium*. Bacq, Z. M., Alexander, P. (eds), Butterworth, Londres, 243-253.
- Roch-Lefèvre, S., Mandina, T., Voisin, P., Gaëtan, G., González-Mesa, J. E., Valente, M., Roy, L., *et al.* (2010). Quantification of γ -H2AX foci in human lymphocytes: A method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure. *Radiation Research*, 174(2), 185–194.
- Rodríguez, P., Barquinero, J. F., Duran, A., Caballín, M. R., Ribas, M., & Barrios, L. (2009). Cells bearing chromosome aberrations lacking one telomere are selectively blocked at the G2/M checkpoint. *Mutation Research*, 670(1-2), 53–58.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on Serine 139 *. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858–5868.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., & Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *The Journal of Cell Biology*, 146(5), 905–915.
- Romero, I., García, O., Lamadrid, A. I., Gregoire, E., González, J. E., Morales, W., Voisin, P., *et al.* (2013). Assessment of simulated high-dose partial-body irradiation by PCC-R assay. *Journal of Radiation Research*, 54(5), 863–871.
- Rothkamm, K., Kru, I., Thompson, L. H., & Lo, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and Cell Biology*, 23(16), 5706–5715.
- Rothkamm, K., Balroop, S., Shekhdar, J., Fernie, P., & Goh, V. (2007). Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure. *Radiology*, 242(1), 244–251.
- Rothkamm, K., Gunasekara, K., Warda, S. A., Krempler, A., & Löbrich, M. (2008). Radiation-induced HPRT mutations resulting from misrejoined DNA double-strand breaks. *Radiation Research*, 169(6), 639–648.

Rowley R, Zorch M, & Leeper, D. (1984). Effect of caffeine on radiation-induced mitotic delay: delayed expression of G2 arrest. *Radiation Research*, 97, 178–185.

S

Sarkaria, J. N., Busby, E. C., Tibbetts, R. S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L. M., & Abraham, R. T. (1999). Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Research*, 59, 4375–4382.

Sasaki, M. S. & Miyata, H. (1968). Biological dosimetry in atomic bomb survivors. *Nature*, 220, 1189–93.

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

Savage, J. R. (1970). Sites of radiation induced chromosome exchanges. *Current Topics in Radiation Research*, 6, 129–194.

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

Sax, K. (1938). Chromosome aberrations induced by X-rays. *Genetics*, 23, 498–516.

Sevan'kaev, A. V., Lloyd, D. C., Edwards, A. A., Mikhailova, G. F., & Nugis, V. Y. (1999). Protracted overexposure to a Cs source: I dose reconstruction. *Radiation Protection Dosimetry*. 81(2), 85–90.

Sevan'kaev, A. V., Lloyd, D. C., Edwards, A. A., Moquet, J. E., Nugis, V. Y., Mikhailova, G. M., Potetnya, I. K., et al. (2002). Cytogenic investigations of serious overexposures to an industrial gamma radiography source. *Radiation Protection Dosimetry*, 102(3), 201–2066.

Sigurdson, A. J., Ha, M., Hauptmann, M., Bhatti, P., Sram, R. J., Beskid, O., Tucker, J. D., et al. (2008). International study of factors affecting human chromosome translocations. *Mutation Research*, 652(2), 112–121.

- Shrivastava, M., De Haro, L. P., & Nickoloff, J. A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research*, 18, 134–147.
- Sreedevi B., Rao, B. S., & Bhatt, B. (1993). Radiation-induced chromosome aberration yields following an accidental non-uniform exposure. *Radiation Protection Dosimetry*, 50(1), 45–49.
- Stark, J. M., Hu P., Pierce A. J., Moynahan M. E., Ellis N. & Jasin M. (2002). ATP hydrolysis by mammalian RAD51 has a key role during homology-directed DNA repair. *Journal of Biology and Chemistry*, 277, 20185–20194.
- Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., & Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 123(7), 1213–1226.

T

- Tanzarella, C., De Salvia, R., & Degrassi, F. (1986). Effect of post-treatments with caffeine during G2 on the frequencies of chromosome-type aberrations produced by X-rays in human lymphocytes during G0 and G1. *Mutagenesis*, 1, 41–44.
- Terzoudi, G. I., Hatzi, V. I., Barszczewska, K., Manola, K. N., Stavropoulou, C., Angelakis, P., & Pantelias, G. E. (2009). G2-checkpoint abrogation in irradiated lymphocytes: A new cytogenetic approach to assess individual radiosensitivity and predisposition to cancer. *International Journal of Oncology*, 35, 1223–1230.
- Tubiana, M., Dutreix, J., Wambersie, A. (1990). *Introduction to Radiobiology*. Taylor & Francis. Londres, Nova York, Philadelphia.

V

Vignard, J., Mirey, G., & Salles, B. (2013). Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up. *Radiotherapy and Oncology*, 108(3), 362–369.

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

W

Wang, C., & Lees-miller, S. P. (2014). Detection and repair of ionizing radiation induced DNA double strand breaks: new developments in non-homogeneous end joining. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics*, 86(3), 440–449.

Y

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

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

7. ANNEX

ANNEX 1.

Pujol, M., Puig, R., Caballín, M. R., Barrios, L., & Barquinero, J. F. (2012). **The use of caffeine to assess high dose exposures to ionising radiation by dicentric analysis.** *Radiation Protection Dosimetry*, 149(4), 392–398.

