

Sensibilidad cromosómica y dosimetría biológica con técnicas de FISH

TESIS DOCTORAL

Sergio Cigarrán Valea

Bellaterra, Enero 2002

El Dr. Lleonard Barrios Sanromá, del Departamento de Biología Celular, Fisiología y Inmunología, profesor titular de la unidad de Biología Celular, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona y

El Dr. Joan Francesc Barquinero Estruch, del Departamento de Biología Animal, Biología vegetal y Ecología, profesor asociado de la unidad de Antropología, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona.

CERTIFICAN

Que Sergio Cigarrán Valea ha realizado, bajo su dirección, el trabajo **Sensibilidad cromosómica y dosimetría biológica con técnicas de FISH**, para obtener el título de Doctor en Ciencias Biológicas.

Bellaterra, Enero 2002.

Dr. Lleonard Barrios Sanromá

Dr. Joan Francesc Barquinero Estruch

Sergio Cigarrán Valea

A mis padres y a
mi mujer

La realización de esta tesis ha supuesto un gran esfuerzo, no solo mío, sino de todas las personas que han estado a mi alrededor, y que de una u otra manera han participado o sufrido conmigo.

Por ello agradezco a mis directores de tesis, Paquito y Leo y a M^a Rosa Caballín Fernández, toda la colaboración, ánimo y empuje que me han dado para realizar esta tesis.

Durante mi estancia en el departamento, han sido muchas las personas que me han tenido que soportar. Empezando por mis compañeros de `radiaciones`, Assumpta, Mar, Pilar, Gerard, Marta y sin olvidarme del resto de compañeros, Pietat, Gemma, Magui, Susana, Yolanda, Paqui, Ángeles, Sandra, Irene, Lorena, Pilar, Joan, Carme, Rafa, Miquel, Natalia, Santi, Alicia, así como de los profesores de la unidad de Antropología. Tampoco me olvido de Pilar Gago, Pilar Lurbe y el “super secre” Javier Jerónimo, sin los cuales ciertos trámites burocráticos y otros “quehaceres” no hubieran sido posibles.

Por último, debo agradecer a Yolanda, mi mujer, la paciencia y comprensión que me ha dedicado, pues sin ella este trabajo no hubiera sido posible.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Radiaciones ionizantes. Aspectos generales	2
1.2 Efecto biológico de las radiaciones ionizantes	3
1.3 Formación de las alteraciones cromosómicas	4
1.4 Dosimetría biológica.	5
1.5 Dosimetría biológica con FISH.	7
1.6 Objetivos.	13
2. MATERIAL Y MÉTODOS	14
2.1 Obtención de las muestras.	15
2.2 Condiciones de irradiación y cultivo.	15
2.3 Hibridación in situ Fluorescente.	15
2.4 Criterios de análisis.	17
2.5 Evaluación estadística.	17
3. ARTÍCULOS	21
3.1 Relationship between DNA-content of human chromosomes and their involvement in radiation-induced structural aberrations, analysed by painting. Cigarrán, S., Barrios, L., Barquinero, J.F., Caballín, M.R., Ribas, M., and Egozcue, J. International Journal of Radiation Biology. 74 (4), 449-455 (1998).	22
3.2 Comparison of x-ray dose-response curves obtained by chromosome painting, using conventional and paint nomenclatures. Barquinero, J.F., Cigarrán, S., Caballín, M.R., Braselmann, H., Ribas, M., Egozcue, J. and Barrios, L. International Journal of Radiation Biology. 75 (12), 1557-1566 (1999).	30
3.3 Cytogenetic analyses by Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization (FISH) in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. Cigarrán, S., Barquinero, J.F., Barrios, L., Ribas, M., Egozcue, J. and Caballín, M.R. Radiation Research. 155, 417-423 (2001).	41

4. DISCUSIÓN	49
4.1 Sensibilidad cromosómica a las radiaciones ionizantes.	50
4.2 Curvas dosis-efecto con pintado cromosómico.	54
4.3 Población ocupacionalmente expuesta a bajas dosis de radiaciones ionizantes.	57
5. CONCLUSIONES	64
6. BIBLIOGRAFÍA	66

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Radiaciones ionizantes. Aspectos generales.

Todo ser vivo está permanentemente expuesto a las radiaciones ionizantes de origen natural, entre las que están las radiaciones cósmicas y las derivadas de los materiales geológicos. Las radiaciones ionizantes de origen geológico pueden afectar tanto de forma externa como interna, en este último caso mediante la incorporación de radionúclidos en la dieta o con la inhalación de gases como el radón y el torón, mientras que las radiaciones ionizantes de origen cósmico afectan solo de forma externa.

De forma natural, los seres vivos están más o menos expuestos a las radiaciones ionizantes según la latitud y altitud en la que viven, y dependiendo de la riqueza de isótopos radiactivos de su entorno. A lo largo del siglo XX, a estas fuentes de radiación natural se han sumado las exposiciones de origen artificial, y entre ellas las debidas a pruebas nucleares, accidentes en centrales nucleares, etc. Sin embargo, las que representan una mayor fracción en el incremento de la exposición, son las debidas a fuentes utilizadas en medicina (radioterapia y radiodiagnóstico).

La radiación ionizante se define como la energía que se propaga en forma de fotones (rayos X y rayos γ) o bien en forma de partículas subatómicas (partículas alfa, beta y neutrones), y es suficientemente alta como para originar la ionización del medio que atraviesa.

La radiación se puede cuantificar en términos de dosis absorbida (D), que es la cantidad de energía de radiación ionizante depositada por unidad de masa del material irradiado y cuya unidad en el sistema internacional es el Gray (Gy), que corresponde a un J/Kg. La energía media depositada a lo largo del recorrido de una partícula por unidad de longitud se denomina Transferencia Lineal de Energía (LET). Los rayos X y rayos γ son radiaciones de baja LET y las radiaciones corpusculares (alfa, beta y los neutrones) son de alta LET. La distribución de la energía absorbida, es decir la forma del patrón de deposición de la energía, influye en el daño biológico de un determinado tipo de radiación. Por tanto, diferentes tipos de radiaciones ionizantes pueden diferir en la eficacia en producir daño biológico; se denominan *eficacia biológica relativa* (RBE) a la relación entre la eficacia de dos tipos de radiaciones. Para tener en cuenta la RBE, se introdujo en radioprotección la dosis equivalente, siendo la unidad en el sistema internacional el Sievert (Sv) (ICRP 60). La dosis equivalente para cada tipo de radiación se obtiene al multiplicar la dosis absorbida por un factor de ponderación.

$$H = w \cdot D$$

Donde " D " es la dosis absorbida y " w " es el factor de ponderación. Un Sievert es la cantidad de radiación de cualquier tipo, equivalente al efecto biológico de 1 Gy de radiación electromagnética (rayos γ y rayos X) y en un rango de energía intermedio. También se incorporó el concepto de

dosis efectiva que permite la comparación del daño biológico de la dosis absorbida en diferentes órganos o tejidos. Ésta, se puede estimar utilizando los factores de ponderación de tejidos u órganos, obtenidos a partir de la sensibilidad de estos tejidos a la inducción de tumores por las radiaciones ionizantes.

1.2.- Efecto biológico de las radiaciones ionizantes.

La interacción de las radiaciones ionizantes con el material biológico puede ionizar moléculas tanto en el citoplasma como en el núcleo. La transferencia de energía al medio puede alterar estructuras biológicas importantes como el ADN de una forma directa, por rotura de moléculas o enlaces a causa de la ionización, o bien de una forma indirecta, produciendo la hidrólisis de moléculas de agua y generando de este modo radicales libres, que con posterioridad pueden provocar lesiones sobre el ADN. Entre las diferentes lesiones, están los daños de base, las roturas de cadena simple, las roturas de cadena doble y las uniones cruzadas DNA-proteína (Goodhead 1994). La lesión más eficaz en la producción de alteraciones cromosómicas es la rotura de doble cadena (Obe y col.1992, Natarajan y col. 1993, Bryant 1997).

Una vez se produce el daño en el DNA, la célula activa mecanismos que pueden conducir hacia la muerte celular programada (apoptosis), o bien a la reparación de los daños originados. La reparación incorrecta de las lesiones, se puede observar en metafase, en forma de alteraciones cromosómicas. Las alteraciones cromosómicas detectadas con mayor frecuencia son:

- ❑ *Lesiones acromáticas*: gaps de cromosoma (csg)
- ❑ *Deleciones intersticiales y terminales*: roturas de cromosoma (csb); fragmentos acéntricos (ace)
- ❑ *Intercambios asimétricos*: cromosomas dicéntricos (dic) con su correspondiente acéntrico (ace); anillos (r)
- ❑ *Intercambios simétricos*: translocaciones recíprocas (t)

Esta clasificación se basa en la observación de las alteraciones cromosómicas con tinción uniforme o con bandas G. Sin embargo, al aplicar el pintado cromosómico, se han observado diferentes patrones de formación de las alteraciones cromosómicas que se pueden agrupar en:

- ❑ *Alteraciones simples* (derivan de 2 roturas en uno o dos cromosomas).
- ❑ *Alteraciones complejas* (3 o más roturas en 2 o más cromosomas), algunas de las cuales se pueden observar también con tinción uniforme (tricéntricos, anillos dicéntricos, etc.).
- ❑ *Alteraciones pseudosimples* (Son las que se pueden detectar como simples mediante pintado cromosómico pero que realmente son alteraciones complejas) (Figura 1).

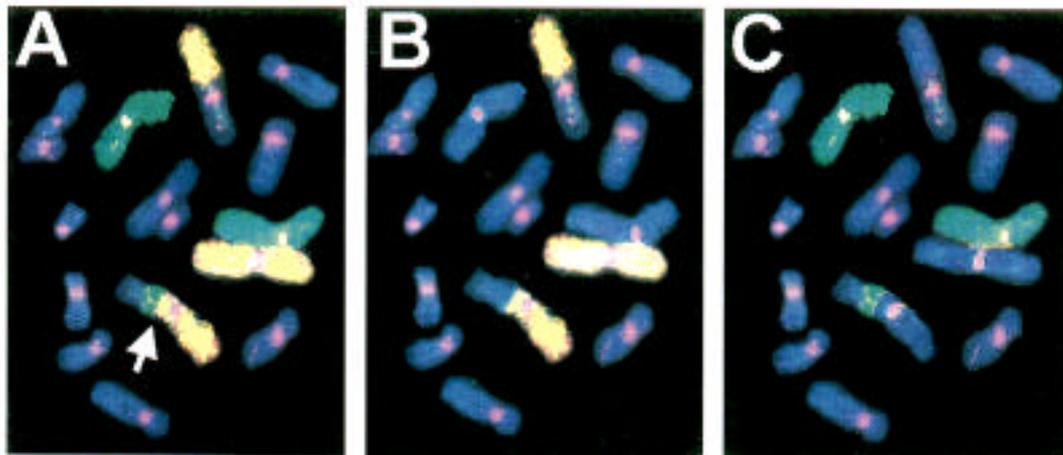


Figura 1. Ejemplo de alteración pseudosimple. Pintado cromosómico con sondas para el cromosoma 1 (amarillo) y el cromosoma 2 (verde). En la foto A, donde se han pintado los dos cromosomas, se observa una alteración en la que están implicados tres cromosomas (compleja). En la foto C, donde solo se ha pintado el cromosoma 2, se observa una inserción (compleja). En la foto B, donde solo se ha pintado el cromosoma 1, se observa una translocación (simple) (Simpson y col. 1999).

La constatación de la existencia de alteraciones pseudosimples, implica que a las alteraciones simples se las deba considerar como *alteraciones aparentemente simples*.

1.3.- Formación de las alteraciones cromosómicas.

Estudiando el efecto de las radiaciones ionizantes en granos de polen de plantas del género *Tradescantia*, Sax (1938) propuso por primera vez la teoría de la *rotura y reunión* sobre la formación de alteraciones cromosómicas, de la que Lea y Catchside (1942) desarrollaron el modelo matemático. La idea básica es que las radiaciones ionizantes inducen una rotura en el cromosoma que produciría dos extremos abiertos. Estas roturas tendrán tres soluciones alternativas: (a) Reunirse y reconstituir el cromosoma original, camino seguido por el 90% de las roturas primarias; (b) Si se produce una segunda rotura próxima a la primera en espacio y tiempo, los extremos rotos pueden interaccionar entre ellos para formar nuevas combinaciones, pudiendo reorganizarse de manera ilegítima y formar alteraciones tipo intercambio. (c) Una fracción de las roturas primarias no llegan a reunirse y aparecen en metafase como deleciones terminales. Cabe remarcar que esta teoría se propuso en una época en la que se desconocía la estructura del DNA, y la de la cromatina a lo largo del ciclo celular, así como los mecanismos de reparación.

En 1955, Revell propuso otra hipótesis, originalmente desarrollada para alteraciones tipo cromátide, llamada *teoría de intercambio*. De acuerdo con esta hipótesis, el primer efecto de la

radiación no es una rotura del cromonema sino una lesión inestable, que si desaparece con el tiempo no da lugar a una rotura visible. Sin embargo, si dos lesiones inestables coinciden en el tiempo y el espacio, pueden iniciar un proceso de intercambio. Esta teoría implica que todas las alteraciones se forman como resultado de un proceso de intercambio, y para que esto se pueda llevar a cabo es necesario un proceso de contacto entre ambas cromátides (bucles de cromátide o bucles de Revell).

Chadwick y Leenhouts (1978, 1981), desarrollaron la teoría molecular de la *recombinación homóloga* o '*one hit*'. Estos autores sugirieron que las roturas e intercambios se originarían a partir de una sola rotura de doble cadena. Para la formación de un intercambio, se induciría una segunda rotura mediante los mecanismos de reparación, en una cadena no dañada que presentaría regiones de homología con la primera. Los intercambios producidos de esta forma podrían explicar el problema sobre la interacción de las roturas distantes que plantea la teoría clásica (Savage 1996). Sin embargo, esta teoría no predice correctamente la frecuencia de alteraciones complejas (Sachs 2000).

La teoría de *rotura y reunión* (teoría clásica), ha sido y es actualmente la más aceptada, sin embargo las evidencias experimentales indican que, la formación de alteraciones cromosómicas posiblemente sea el resultado de mecanismos propuestos en los tres modelos.

1.4.- Dosimetría biológica.

La aparición de las fuentes de radiación artificial, lleva intrínsecamente unido el riesgo de accidente y sobre-exposición a las radiaciones ionizantes. Las personas que trabajan con material radiactivo o en instalaciones radiactivas, llevan dosímetros físicos que ayudan a cuantificar la dosis de radiación y por tanto a controlar que no se sobrepasen los límites de exposición legalmente establecidos (dosis límite anual media 20 mSv). En caso de accidente, estos dosímetros físicos ayudan a determinar la dosis recibida. Sin embargo, si la magnitud del accidente sobrepasa los límites de las instalaciones radiactivas, puede llegar a afectar a personas que no lleven consigo un dosímetro físico por lo que se desconocerá la dosis de exposición. En estos casos para intentar determinar la dosis recibida, se puede realizar una investigación mediante métodos biológicos. El análisis de la frecuencia de cromosomas dicéntricos (dic) en linfocitos humanos, es el método biológico de elección para la estimación de dosis recibidas (Beninson y col 1986) (Figura 2). Este método se aplicó por primera vez en un accidente en 1962 donde tres individuos estuvieron expuestos a rayos γ y neutrones de fisión (Bender y Gooch 1966).



Figura 2. Metafase observada con tinción uniforme, en donde se aprecian diferentes cromosomas dicéntricos (triángulos) y fragmentos acéntricos (flechas).

Las células utilizadas para el estudio de alteraciones cromosómicas son los linfocitos, ya que son fáciles de obtener, están en continua circulación por el cuerpo, y se encuentran en estado quiescente (G_0). Determinadas poblaciones de linfocitos T, pueden ser estimuladas a dividirse *in vitro* tras la exposición a agentes mitógenos como la fitohemaglutinina (PHA). Esta característica permite que las posibles lesiones en el DNA puedan visualizarse en los cromosomas metafásicos. Aunque las radiaciones ionizantes inducen una gran variedad de alteraciones cromosómicas, hasta hace poco se han utilizado básicamente los cromosomas dicéntricos porque son fáciles de observar al microscopio, y su frecuencia basal es muy baja (1-2 por mil células) en individuos no expuestos a radiaciones ionizantes. Para poder visualizar todas las alteraciones cromosómicas que se hayan inducido por las radiaciones ionizantes, es necesario analizar metafases en primera división mitótica, siendo necesario para ello, añadir bromodeoxiuridina (BrdU) al medio de cultivo (Perry y Wolf 1974). Aproximadamente entre un 95-99% de las metafases obtenidas a partir de cultivos de 48 h se encuentran en primera división.

El establecimiento de una curva dosis efecto en el propio laboratorio es el principal requisito para la estimación de la dosis recibida. Todos los tipos de radiaciones ionizantes inducen los mismos tipos de alteraciones cromosómicas. No obstante, la frecuencia de cada tipo de alteración y su distribución por célula depende de la dosis, la tasa de dosis, y de la LET de la radiación. Las radiaciones de baja LET (rayos X y rayos γ) realizan una deposición de energía dispersa. Por contra las radiaciones de alta LET (partículas alfa, beta y neutrones) interaccionan densamente

con el medio, por lo que inducen más ionizaciones y más concentradas en unas células que en otras. La frecuencia de dicéntricos por célula en relación con la dosis absorbida, sigue un modelo lineal-cuadrático:

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2$$

Dónde Y corresponde a la frecuencia de dicéntricos; C es la frecuencia basal de dicéntricos; D la dosis; y α y β son los coeficientes lineal y cuadrático respectivamente, obtenidos del análisis estadístico (Lea y Catcheside 1942, Catcheside 1946, Neary 1965). De acuerdo con la teoría clásica, para la formación de un dicéntrico se necesitan dos roturas, una en cada uno de los cromosomas implicados en la reorganización. El término lineal (D) representa la inducción de las dos lesiones por una única trayectoria ionizante, mientras que el término cuadrático (D^2) representa la inducción de las dos lesiones por dos trayectorias diferentes. El factor α varía según la calidad de la radiación, siendo superior para radiaciones de alta LET. Para radiaciones de baja LET, el factor α depende de la tasa de dosis, a medida que sube la LET el factor α tiende a desaparecer y la relación entre dicéntricos y dosis tiende a ser lineal. Se considera que para cubrir la mayoría de casos a analizar mediante dosimetría biológica es necesario disponer de curvas dosis efecto para rayos X, rayos γ , y neutrones (Beninson y col 1986).

1.5.- Dosimetría biológica con FISH.

Las alteraciones tales como dicéntricos, acéntricos y anillos, presentan problemas de segregación durante la mitosis, y habitualmente dan lugar a pérdida de material genético que da como resultado una disminución de la viabilidad celular y un incremento de la muerte celular. Ello implica que a medida que transcurre el tiempo post-irradiación, la frecuencia de dicéntricos desciende con respecto a la frecuencia de otras alteraciones más estables como las translocaciones, debido a la disminución de precursores linfáticos con dicéntricos. Por ello se considera que para la estimación de dosis en casos donde la exposición tuvo lugar hace tiempo o en casos de exposiciones crónicas a radiaciones ionizantes, es más adecuado el análisis de translocaciones. Este tipo de análisis se puede realizar mediante la aplicación de técnicas de bandas cromosómicas (bandas G o bandas R), aunque este análisis es muy lento y laborioso. Las técnicas de FISH, y en particular el pintado cromosómico (Pinkel y col. 1986), permite una fácil detección tanto de translocaciones como de dicéntricos, motivo por el cual han sido de gran aplicación en los últimos años en estudios sobre el efecto genético de las radiaciones ionizantes. Sin embargo, el análisis de translocaciones mediante pintado cromosómico ha puesto de relieve que existen factores que no se habían considerado anteriormente en los estudios de dicéntricos y que ahora, con el estudio de translocaciones deben ser tenidos en cuenta (Edwards 2000). Uno de estos aspectos viene determinado por la necesidad

de distinguir las translocaciones de los cromosomas dicéntricos dado que tal como se ha comentado los dicéntricos son alteraciones mitóticamente inestables, mientras que las translocaciones no. En los primeros estudios que utilizaban el pintado cromosómico, la presencia o no de centrómero en las diferentes alteraciones se distinguía a partir de la contratinción con DAPI, que marca de forma más intensa las regiones centroméricas (Figura 3A). La frecuencia de alteraciones estables e inestables inducidas por las radiaciones ionizantes debía ser igual, de acuerdo con la teoría clásica (*rotura y reunión*). En algunos estudios, se ha observado que la relación t / dic es igual o ligeramente superior al valor teórico 1 (Kovacs y col. 1994; Finnon y col. 1995). Por el contrario, en otros trabajos, esta relación oscila entre 1.4 y 2.4 (Lucas y col. 1989; Natarajan y col. 1992; Schmid y col. 1992; Nakano y col. 1993; Tucker y col. 1993; Stephan y Pressl 1997). Nakano y col. (1993), analizando con FISH los cromosomas 1, 2 y 4 encontraron una relación t / dic de 1.58, pero posteriormente, después del análisis con bandas G de las mismas metafases, la relación t / dic fue de 1.06. Straume y Lucas (1993), demostraron que el exceso de translocaciones, analizando los cromosomas 1, 2 y 4, desaparecía con la utilización de sonda pancentromérica (marcaje fluorescente de todos los centrómeros) (Figura 3B).

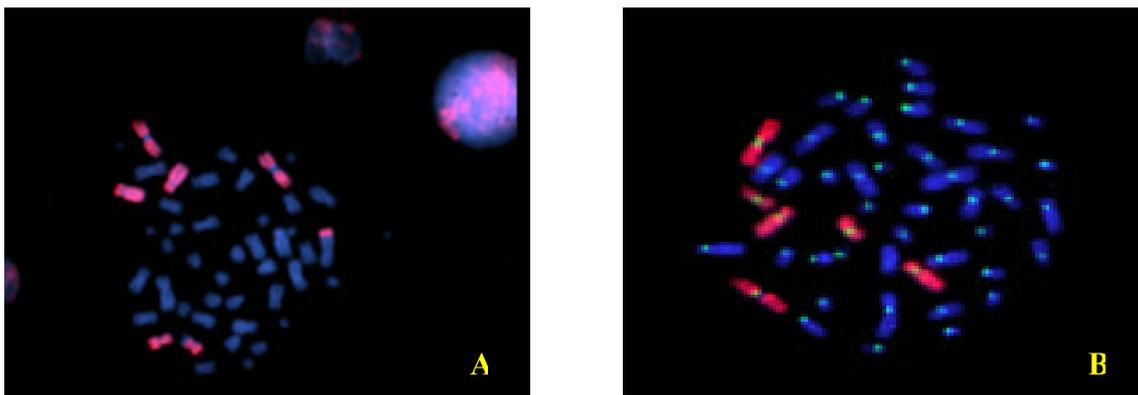


Figura 3. Metafases observadas tras la aplicación de la técnica de FISH. En ambas fotos los cromosomas 1, 4 y 11 se han hibridado con sondas marcadas con Cy3 (rojo), mientras que en la foto B los centrómeros se han hibridado además con una sonda pancentromérica marcada con FITC (Verde). (A) Metafase con una translocación. (B) Metafase normal.

Mientras que en los estudios de cromosomas dicéntricos con tinción uniforme, se analizan todos los cromosomas de cada metafase y se calcula la frecuencia de dicéntricos por célula, con la técnica de pintado cromosómico, solo se contabilizan las alteraciones del o de los cromosomas pintados, por lo que para poder estimar el número de translocaciones en la totalidad del genoma, se debe realizar una extrapolación mediante la fórmula descrita por Lucas y col. (1992b):

$$F_G = \frac{n}{2,05 \sum N_i f_i (1 - f_i)}$$

Donde n = suma de alteraciones tipo intercambio; N_i = número de células analizadas para el cromosoma “ i ” (pintado); f_i = contenido relativo de DNA para el cromosoma “ i ” (Morton 1991). Esta fórmula considera que las roturas se producen al azar, es decir, un cromosoma estará mas o menos afectado según su contenido relativo de DNA y que los cromosomas son uniformemente sensibles a las roturas. Mediante técnicas de bandas G, diversos estudios habían mostrado que la distribución de los puntos de rotura implicados en las alteraciones cromosómicas inducidas por las radiaciones ionizantes podría no ser al azar. Bauchinger y Götz 1979, describieron un exceso de roturas en 1p. Barrios y col. 1989, Lucas y col. 1992b y Sachs y col. 1993, observaron también un exceso de participación del cromosoma 1 en la formación de alteraciones tipo intercambio. Mediante el análisis con bandas G, ciertas translocaciones pueden pasar inadvertidas. Diversos estudios utilizando pintado cromosómico han mostrado que la participación de los cromosomas en las alteraciones inducidas por las radiaciones ionizantes, no depende de los valores esperados según su contenido de DNA (Pandita y col. 1994, Tucker y Senft, 1994b, Knehr y col. 1996, Barquinero y col.1998). Sin embargo, otros trabajos si han encontrado un buen ajuste en relación a lo esperado (Natarajan y col. 1992, Tucker y col. 1993, Matsuoka y col. 1994, Gebhart y col. 1996). Por ello existe la controversia sobre la selección de los cromosomas más adecuados para su utilización en dosimetría biológica.

La aplicación de la técnica de pintado cromosómico, ha puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos sistemas para describir las alteraciones cromosómicas. Tradicionalmente las alteraciones cromosómicas se han clasificado de acuerdo a la nomenclatura convencional (ver ISCN 1995). Sin embargo, la gran cantidad de alteraciones tipo intercambio que se pueden apreciar con esta técnica dificulta su clasificación con esta nomenclatura. Se han propuesto dos nomenclaturas para el análisis con pintado cromosómico:

- Nomenclatura PAINT (Protocol for Aberration Identification And Nomenclature Terminology, Tucker y col. 1995a)
- Nomenclatura S&S (Savage y Simpson 1994a,b).

De forma breve, la nomenclatura PAINT asigna a cada figura alterada la designación propuesta por los criterios de la ISCN (t, dic, r, ace, etc.), a continuación entre paréntesis se ponen las letras **a** o **A** (si es material contrateñido), **b** o **B** (si está hibridado con el fluorocromo 1), **c** o **C** (si está hibridado con el fluorocromo 2), etc, y escritas en mayúsculas o minúsculas dependiendo de si tiene o no centrómero. Se trata por lo tanto de una nomenclatura muy descriptiva. Sin embargo,

cada figura alterada se considera de forma independiente, por lo que por ejemplo una translocación recíproca, la nomenclatura PAINT la describiría como una t(Ba) y una t(Ab), contabilizándose como dos translocaciones. Por tanto esta nomenclatura no considera los mecanismos de formación de la alteración.

La nomenclatura S&S, se desarrolló teniendo en cuenta los mecanismos de formación de la alteración cromosómica. Inicialmente, las alteraciones se clasificaron utilizando las “easy score sheets”, que constan de 203 casillas en las que se incluyen las posibles alteraciones observadas con pintado cromosómico, derivadas de los intercambios producidos por hasta 5 roturas en 5 brazos de 5 cromosomas diferentes. En las “easy score sheets” modificadas tras la aparición de la nomenclatura PAINT, a cada casilla con una alteración cromosómica determinada, se le asigna una designación S&S, la descripción PAINT y el mínimo número de roturas (mnr) requerido para la formación de la alteración. Así una translocación recíproca simple se definiría como una 2B, [t(Ba) t(Ab)] y 2 mnr. Un inconveniente que presenta esta nomenclatura es que no se puede aplicar cuando se utiliza más de un cromosoma pintado del mismo color. Las 203 posibles alteraciones cromosómicas descritas por la nomenclatura S&S, surgen de la idea de que toda rotura cromosómica es reparada. Por lo tanto, teniendo en cuenta esta premisa, si en una metafase se detecta por ejemplo una t(Ab), se debería también detectar la correspondiente t(Ba). La evidencia empírica de muchos laboratorios indica que es posible detectar alteraciones incompletas, es decir sin la alteración complementaria correspondiente.

Knehr y col. (1998), propusieron un sistema que combina el fundamento básico de estas dos nomenclaturas. Proponen modificar la nomenclatura PAINT de acuerdo a los aspectos mecanísticos de la nomenclatura S&S, e incluir las alteraciones aparentemente incompletas que no se tienen en cuenta en el sistema S&S. De esta manera cada metafase se describe como una entidad, y las alteraciones se clasifican considerando la reorganización más sencilla posible. Así, una metafase con [t(Ba) t(Ab) dic(BA) ace(ab)], se considera que tiene una translocación recíproca completa aparentemente simple y un dicéntrico completo aparentemente simple (Tabla 1).

Las alteraciones incompletas representan otro aspecto de la problemática del análisis de translocaciones con FISH. Por ejemplo, una translocación incompleta puede tener implicaciones en el funcionamiento celular y por lo tanto no sería una alteración perdurable en el tiempo. El hecho de que las alteraciones incompletas sean o no reales, está siendo debatido. Kodama y col. (1997), estiman que el tamaño mínimo que se puede detectar en el microscopio de fluorescencia es de $11.1 \pm 0,8$ Mb para un fragmento pintado y de $14.6 \pm 0,6$ Mb para un fragmento no pintado. Boei y col. (1998) observan que más del 85% de las alteraciones incompletas son el resultado de intercambios terminales, por lo tanto son alteraciones completas. En este mismo sentido, Fomina y

col. (2000) analizando las alteraciones ocurridas en el cromosoma 8 con sonda pancentromérica y sonda pantelomérica, encuentra solo un 5% de alteraciones incompletas verdaderas. Pese a que todavía se discute sobre que tipo de alteración es más adecuado analizar en dosimetría biológica, a la vista de estos resultados parece que lo más apropiado es tener en cuenta tanto las alteraciones completas como las incompletas.

En relación con la frecuencia basal de las diferentes alteraciones cromosómicas en la población general, la frecuencia de cromosomas dicéntricos es baja (1-2 dicéntricos por 1000 células) y no muestra una gran variación entre individuos. Por el contrario, La frecuencia basal de translocaciones determinada mediante técnicas de FISH, es más elevada y oscila entre 2 y 10 translocaciones por 1000 células, con importantes variaciones interindividuales. Al igual que para dicéntricos, algunos autores han encontrado que el hábito de fumar incrementa la frecuencia de translocaciones, aunque en otros estudios no se observa esta relación. Por otro lado, se ha descrito que la edad es el factor que más influye sobre la frecuencia de translocaciones. Las aproximaciones realizadas a partir de poblaciones con individuos de edades de entre 0 y 100 años, indican que existe una relación cuadrática (Tucker y col. 1994a), cúbica (Ramsey y col. 1995) o lineal-cuadrática (Lucas y col. 1999) con la edad de los individuos. La elevada frecuencia basal de translocaciones, la amplia variabilidad entre individuos y los factores condicionantes como la edad, representan un problema añadido a la dosimetría biológica con FISH y en especial en los casos de exposiciones a bajas dosis de radiaciones ionizantes. Pese a ello, las técnicas de FISH se han aplicado en diferentes investigaciones sobre exposiciones crónicas a radiaciones ionizantes, así como en casos de exposiciones accidentales del pasado. La elevada frecuencia basal de translocaciones y sobre todo la variabilidad interindividual hace que en alguno de esos estudios el cálculo de la dosis solo se pudiera establecer a un nivel de grupo. Actualmente la dosis mínima de detección de exposición a radiaciones ionizantes con técnicas de FISH es superior a la de dicéntricos (0,1 Gy). Algunos trabajos indican que se puede estimar dosis de 0,5 Gy en individuos mayores de 60 años (Moquet y col. 2000), mientras que otros han establecido este umbral en 0,3 Gy (< 40 años) y 0,5 Gy (> 40 años), incluso se ha considerado la posibilidad de estimar dosis de 0,25 Gy utilizando una combinación de cromosomas que abarque el 20% del genoma y analizando 15.000 metafases.

FIGURAS	PAINT Modificada	CONVENCIONAL	S&S
	dic(BA) ace(ab)	dic completo	2A
	t(Ba) t(Ab)	t completa	2B
	t(Ba) ace(b)	t incompleta	(I)
	t(Ab)	t incompleta	(II)
	t(Ba)	t incompleta	(III)
	dic(BA) ace(b)	dic incompleto	(IV)
	ace(ab)	dic incompleto	(V)
	dic(BA)	dic incompleto	(VI)
	t (Ba) ace(ab)	Alteración compleja	2F
	dic(BA) t(Ab)	Alteración compleja	2G

Tabla 1. Esquema de diferentes tipos de alteraciones que se pueden encontrar con la técnica de pintado cromosómico, descritas con las nomenclaturas PAINT modificada, convencional y S&S.

1.6.- Objetivos.

1. Valorar si la sensibilidad de los cromosomas humanos a las radiaciones ionizantes es dependiente de su contenido relativo de DNA.
2. Elaborar curvas dosis-efecto para rayos X, utilizando diferentes alteraciones cromosómicas detectadas mediante técnicas de FISH.
3. Estudiar mediante FISH una población crónicamente expuesta a bajas dosis de radiaciones ionizantes que ya había sido objeto de estudio mediante técnicas de tinción uniforme.

2.- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.- Obtención de las muestras.

Para el estudio de la sensibilidad cromosómica, se extrajeron 20 mL de sangre periférica mediante venipunción antero cubital y con una jeringuilla previamente heparinizada, de un donante adulto sano de sexo masculino y no expuesto a agentes mutágenos. La misma metodología se empleó para la obtención de las muestras que se utilizaron en la realización de las curvas dosis-efecto. y para el estudio de la población ocupacionalmente expuesta, aunque en este último caso se extrajeron 5 mL de sangre periférica de cada individuo.

2.2.- Condiciones de irradiación y cultivo.

Las irradiaciones de las muestras de sangre se realizaron utilizando una fuente de rayos X y siguiendo las recomendaciones de la IAEA (Benison y col. 1986). Brevemente, se llenan completamente con sangre periférica dos tubos de plástico de 9 mL de punta redonda y se colocan en un baño precalentado a 37°C. Para mantener el equilibrio electrónico durante la irradiación, la muestra se coloca en posición horizontal y sumergido justo por debajo de la superficie del agua. El campo de irradiación es de 15x20 cm y la distancia de la fuente a la superficie del agua es de 40 cm. Con estas condiciones se procedió a irradiar la muestra a una tasa de dosis de 26.95 cGy/min. Posteriormente se deja la muestra durante 1h 30 min. a 37°C antes de proceder al cultivo.

Las condiciones del cultivo de las muestras fue el mismo en todos los estudios. A 5 mL de medio completo (RPMI suplementado con antibióticos, suero bovino fetal y fitohemaglutinina), se añade 0.75 mL de sangre y se incuban a 37°C durante 48h. Paralelamente en uno de los cultivos se añade BrdU (Perry y Wolf 1974). Dos horas antes de la extracción del cultivo se añade 0.3 µg/mL de colcemid®. Para la extracción del cultivo se realiza un tratamiento hipotónico (KCl 0.075 M) a 37°C y fijación y lavados con Carnoy (Metanol : ác. acético [3:1]).

2.3.- Hibridación in situ Fluorescente.

En el estudio de la sensibilidad cromosómica, para realizar el pintado de todos los cromosomas, se ha utilizado el "kit" Chromoprobe-M Multiprobe System (Cytocell). La peculiaridad del "kit" es que hace posible el pintado cromosómico de todos los cromosomas, de forma separada y en un mismo portaobjetos. El "kit" incorpora un portaobjetos que está dividido en 24 áreas y numerado conforme a los diferentes pares cromosómicos, y un soporte multisonda, del mismo tamaño que el portaobjetos, con 24 pocillos, cada uno de los cuales contiene la sonda de un cromosoma, marcada con Cy3, (Figura 4).

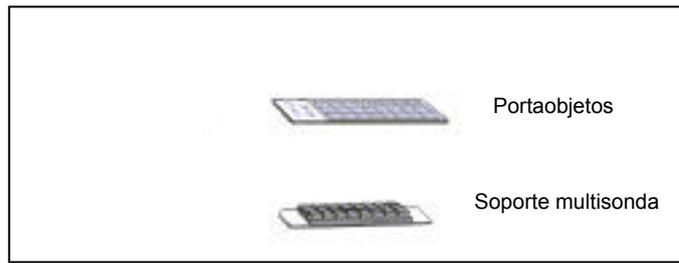


Figura 4. Portaobjetos y soporte multisonda del Kit de "Cytocell"

Previamente al comienzo de la hibridación se realizan las extensiones cromosómicas sobre el portaobjetos suministrado. Estas extensiones se realizan dispensando 2 μL de la muestra en cada área. Para la hibridación se procede a preparar, la cámara de hibridación, la solución de hibridación y el soporte multisondas que se precalientan a 37°C, y se calienta la placa calefactora a 75°C. Una vez a punto todo el material se comienza la hibridación, se añaden 2 μL de solución de hibridación a cada pocillo del soporte multisondas, después se hace coincidir el portaobjetos con el soporte de forma que queden correctamente encuadradas las diferentes áreas del portaobjetos con su pocillo correspondiente. Una vez encarados y unido el portaobjetos con el soporte, se ponen en la placa calefactora a 75°C durante 5 minutos, colocándose después en el interior de la cámara de hibridación ("overnight" a 37°C). Al día siguiente, se realizan los lavados post-hibridación y la contratinción con DAPI siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante.

La técnica aplicada en la elaboración de curvas dosis-efecto y en el estudio de la población ocupacionalmente expuesta, ha sido el pintado cromosómico de los cromosomas 1, 4 y 11, marcados con Cy3, conjuntamente con una sonda pancentromérica marcada con FITC (CAMBIO). La técnica empleada consiste en una modificación del protocolo suministrado por la casa comercial, de forma que se adaptó para poder realizar la hibridación simultánea con la sonda pancentromérica. Se utilizan preparaciones cromosómicas envejecidas entre 2 y 3 días. Primero se prepara la mezcla de las sondas cromosómicas, más la solución de hibridación y se ponen durante 5 minutos en un baño a 72°C (desnaturalización), transcurrido este tiempo se pasa a un baño a 37°C en el que permanecerá entre 60 y 90 minutos. Pasados 30-60 minutos desde la desnaturalización de la sonda, se prepara la alícuota de la sonda pancentromérica, después se comienza la deshidratación de los portaobjetos y su desnaturalización, 2 minutos en una solución de 70% formamida/2xSSC a 72°C. Después de la desnaturalización las preparaciones cromosómicas se deshidratan en una serie de etanoles fríos (70%, 85% y 100%). Durante este paso se procede a desnaturalizar la sonda pancentromérica, 5 minutos en un baño a 72°C. Una vez finalizada esta desnaturalización se pone la sonda en un baño con hielo no más de 10 minutos. Se mezclan las dos sondas (cromosómicas y pancentromérica) y se procede a dispensar la mezcla

sobre el portaobjetos, se tapa con un cubreobjetos y se coloca en la cámara de hibridación ("overnight" a 37°C). Al día siguiente, se realizan los lavados post-hibridación y la contratinción con DAPI de acuerdo con los protocolos suministrados por el fabricante.

2.4.- Criterios de análisis.

En el estudio de la sensibilidad cromosómica (Figuras 5 y 6), las diferentes alteraciones observadas se han analizado considerando dos parámetros:

- El Mínimo Número de Roturas (MNR).
- Alteraciones Tipo Intercambio (ATI).

Primero se analizan las metafases siguiendo la nomenclatura convencional, fijándonos únicamente en las alteraciones en las que está implicado el cromosoma pintado. De esta forma se describe el tipo de alteraciones tales como translocaciones, dicéntricos, acéntricos y otras alteraciones. Las translocaciones y dicéntricos en algunos casos se podían diferenciar gracias a la afinidad del DAPI por la heterocromatina de los centrómeros, sin embargo, para evitar errores se han englobado las translocaciones y los dicéntricos como alteraciones tipo intercambio. Para contabilizar el número de roturas se han tenido en cuenta solamente las roturas que afectan al cromosoma pintado. De esta forma, se estimó cual sería el mínimo número de roturas en el cromosoma pintado necesarias para originar la alteración observada.

En los otros dos estudios (Figuras 7 y 8), gracias a la utilización de la sonda pancentromérica, las alteraciones observadas se describieron siguiendo la nomenclatura PAINT modificada (Knehr y col. 1998) y posteriormente se clasificaron de acuerdo con las nomenclaturas convencional y PAINT (ver Tabla 1).

2.5.- Evaluación estadística.

Con la técnica de pintado cromosómico sólo se contabilizan las alteraciones en las que está involucrado el o los cromosomas pintados. Por ello es necesario la estimación de las frecuencias genómicas (F_G) (Lucas y col. 1992b). En los tres estudios se han podido realizar las comparaciones entre diferentes frecuencias de alteraciones cromosómicas mediante la F_G . Sin embargo, para el trabajo de la sensibilidad cromosómica se consideraron el MNR en el cromosoma pintado, y por ello para estimar la F_G se realizó una modificación de la fórmula propuesta por Lucas y col. (1992b), en la que se eliminó el componente correspondiente a la fracción no pintada.

El test χ^2 de Pearson se empleó para: (a) Comparar la homogeneidad entre las frecuencias de alteraciones en los diferentes cromosomas en el estudio de la sensibilidad. (b) La valoración de las diferencias individuales en la población ocupacionalmente expuesta. (c) El ajuste de las diferentes curvas realizadas. En el caso de la sensibilidad cromosómica también se utilizó el test U-Papworth para valorar si la distribución de alteraciones por célula seguía una distribución de Poisson. Así mismo, se empleó el test de Signos en la valoración de las tendencias observadas en los diferentes cromosomas. En el estudio de las curvas dosis-efecto, para la comparación de las diferentes curvas se utilizó el test F-Fisher. En el trabajo sobre la población ocupacionalmente expuesta, para comparar las frecuencias de alteraciones entre las dos poblaciones y los diferentes subgrupos (fumadores y sexo), se empleó el test U Mann-Whitney y en la valoración de la edad el test de correlación de Rangos de Spearman.

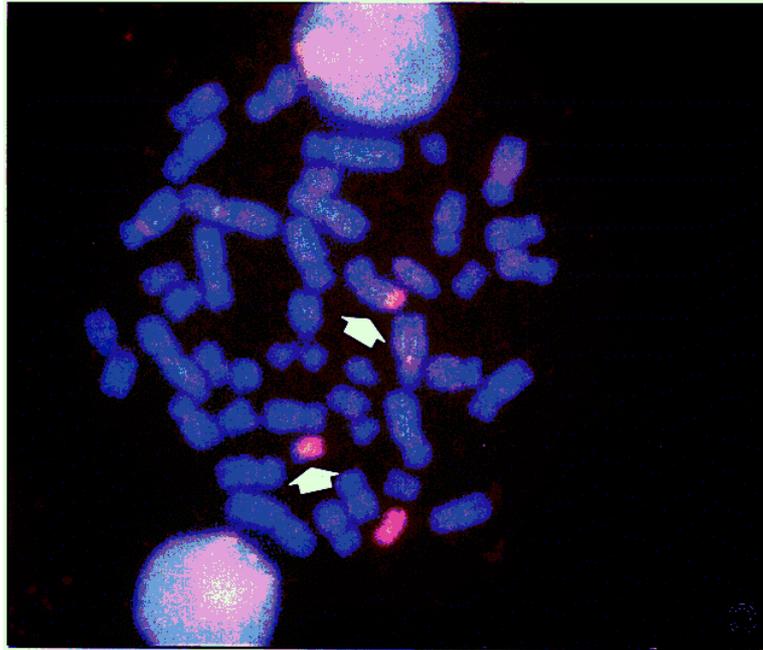


Figura 5. Metafase con una translocación. Se ha aplicado la técnica de pintado cromosómico con la sonda del cromosoma 20. El mínimo número de roturas (MNR) en el cromosoma pintado necesario para originar esta alteración es uno. Esta alteración se ha considerado como tipo intercambio (ATI).

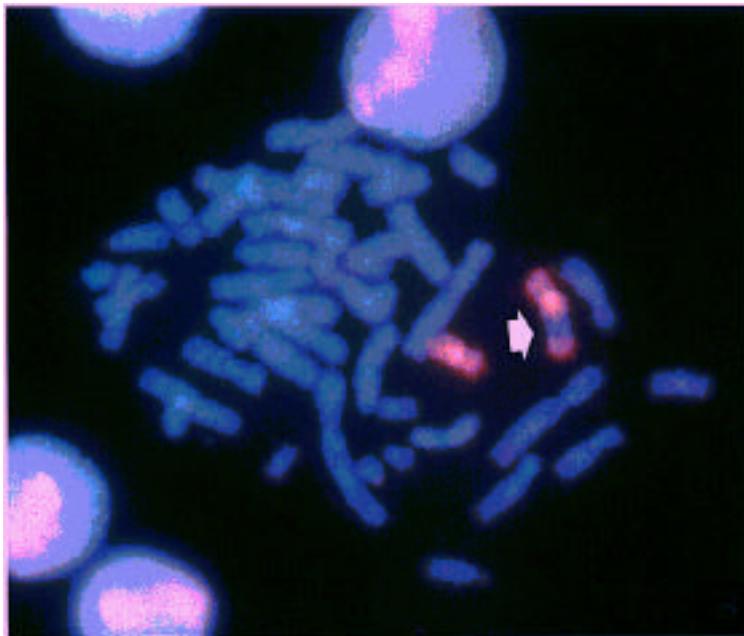


Figura 6. Metafase con una inserción. Se ha aplicado la técnica de pintado cromosómico con la sonda del cromosoma 16. El mínimo número de roturas (MNR) en el cromosoma pintado necesario para originar esta alteración es uno.

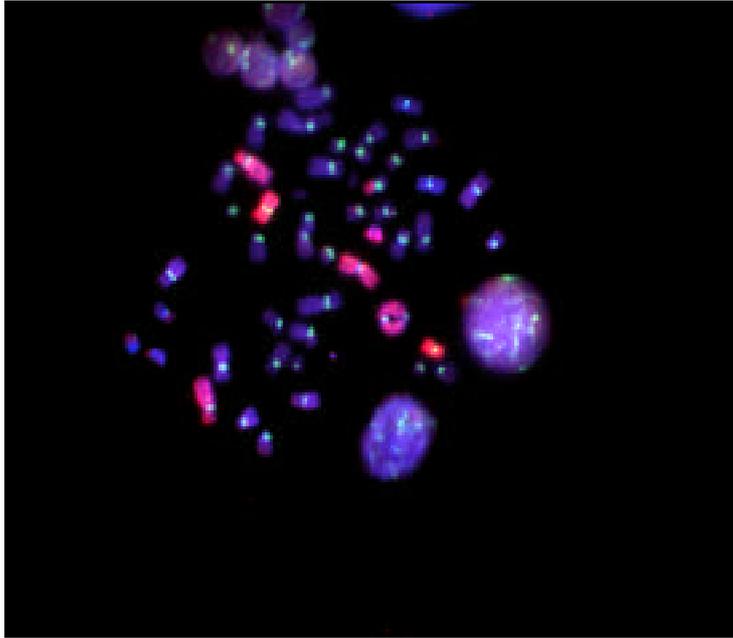


Figura 7. Pintado cromosómico de los cromosomas 1, 4 y 11 con sonda pancentromérica. Se puede observar la siguiente alteración compleja: [r-dic(BA) ace(ab) t(Ab)]

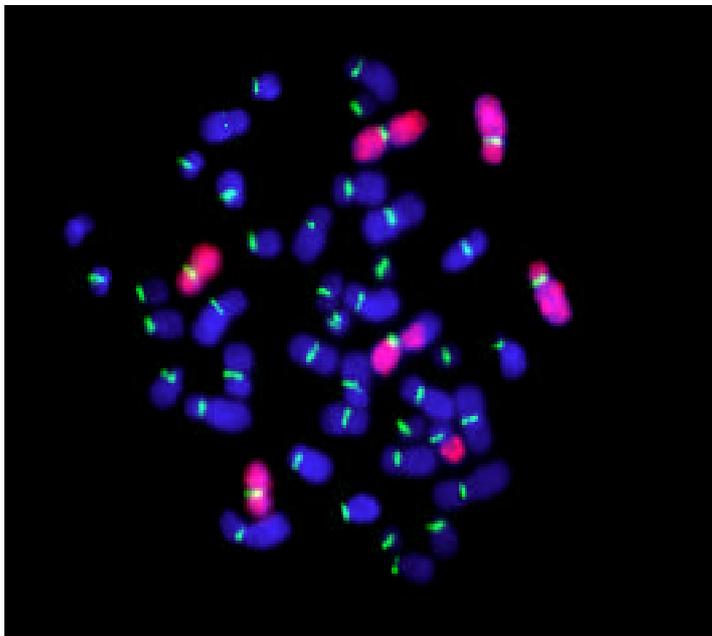


Figura 8. Pintado cromosómico de los cromosomas 1, 4 y 11 con sonda pancentromérica. Se puede observar una translocación completa [t(Ba) t(Ab)].

3.- ARTÍCULOS

3.1 RELATIONSHIP BETWEEN DNA-CONTENT OF HUMAN CHROMOSOMES
AND THEIR INVOLVEMENT IN RADIATION-INDUCED STRUCTURAL
ABERRATIONS, ANALYSED BY PAINTING.

S.Cigarrán, L. Barrios, J.F. Barquinero, M.R.Caballín, M.Ribas, J.Egozcue.

INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY 74, 4: 449-455 (1998).

3.2 COMPARISON OF X-RAY DOSE-RESPONSE CURVES OBTAINED BY CHROMOSOME PAINTING USING CONVENTIONAL AND *PAINT* NOMENCLATURES.

J.F. Barquintero, S.Cigarrán, M.R.Caballín, H. Braselmann, M.Ribas, J.Egozcue, L. Barrios.

INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY 75, 12: 1557-1566 (1999).

3.3 CYTOGENETIC ANALYSES BY FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION (FISH) IN HOSPITAL WORKERS OCCUPATIONALLY EXPOSED TO LOW LEVELS OF IONIZING RADIATION.

S.Cigarrán, J.F. Barquinero, L. Barrios, M.Ribas, J.Egozcue, M.R.Caballín.

RADIATION RESEARCH 155: 417-423 (2001).

4.- DISCUSIÓN

4.1.- Sensibilidad cromosómica a las radiaciones ionizantes.

La utilización de las técnicas de FISH para valorar el efecto citogenético de las radiaciones ionizantes, ha permitido evaluar si existen diferencias de sensibilidad entre los diferentes cromosomas humanos respecto a su participación en las alteraciones cromosómicas. Después de varios años de utilización de estas técnicas, parece ser que al menos en el campo de la dosimetría biológica, lo más adecuado es utilizar una combinación de sondas de cromosomas enteros, generalmente de tres cromosomas, que abarquen aproximadamente un 20% del genoma (Knehr y Bauchinger 2000).

Los primeros estudios utilizando bandas G, indicaron que la participación de los cromosomas en alteraciones inducidas por radiaciones ionizantes, podría no ser al azar (Bauchinger y Götz 1979, Barrios y col. 1989, Sachs y col. 1993). En estos estudios se observó gran variabilidad en cuanto a la participación de cada uno de los cromosomas, y se apreciaba un exceso de participación del cromosoma 1. También se indicó la posibilidad de que las alteraciones se concentraran en las bandas G claras (Barrios y col. 1989). Igualmente Folle y col. (1998) estudiando cromosomas procedentes de ovarios de Hamster Chino, encontraron que más del 60% de las roturas se produjeron en bandas G claras. Es importante destacar que el análisis con bandas G es laborioso y que algunas translocaciones pasan inadvertidas. Además, tal y como se ha comprobado con técnicas combinadas de bandas G y R, hay una tendencia subjetiva a localizar el punto de rotura en las bandas claras (Savage 1977).

La técnica de pintado cromosómico permite la detección de un mayor espectro de alteraciones cromosómicas, siendo muy útil para valorar los efectos de las radiaciones ionizantes en cada cromosoma. El uso del pintado cromosómico en dosimetría biológica parte de la base de que los cromosomas son uniformemente sensibles a las roturas, y que los puntos de rotura se producen al azar. Por lo tanto, los distintos cromosomas se verán más o menos implicados según su contenido de DNA. Existen resultados contradictorios en los diferentes trabajos realizados con pintado cromosómico, en lo que respecta a la implicación de los diferentes cromosomas en alteraciones teniendo en cuenta el contenido de DNA:

- Natarajan y col. (1992), no apreciaron diferencias en el resultado utilizando de dos combinaciones de sondas cromosómicas diferentes (1,3,7) y (2,4,8).
- Tucker y col. (1993), hallaron una buena correlación con el contenido de DNA utilizando una combinación de sondas para los cromosomas (1,3,4) y también para el cromosoma 4 solo.
- Matsuoka y col. (1994), no obtuvieron diferencias en la eficiencia de detección de translocaciones, con dos combinaciones de sondas (1,3,4) y (1,4).

- Gebhart y col. (1996) utilizando los cromosomas 1, 2 y 4 marcados con tres colores diferentes, no obtuvieron diferencias con lo esperado en relación con el contenido de DNA.

Sin embargo existen varios trabajos donde no se observa una correlación entre las frecuencias de las alteraciones inducidas y el contenido de DNA.

- Pandita y col. (1994), analizando los cromosomas 1, 2, 7, 16 y 17, observaron un mayor número de roturas en los cromosomas 1 y 2.
- Knehr y col. (1996), analizando 12 cromosomas (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 y X), observaron que los cromosomas 2 y 3 estaban menos implicados de lo esperado en translocaciones simétricas y el cromosoma 9 más de lo esperado, además, los cromosomas 9 y 10 estaban más implicados de lo esperado en translocaciones asimétricas.
- Barquinero y col. (1998), analizando todos los cromosomas excepto el Y, observaron que los cromosomas 2, 3 y 6 estaban menos implicados y los cromosomas 16, 17 y 20 más implicados de lo esperado.

Estos resultados no ayudan a comprender si el efecto de las radiaciones se produce al azar o no entre los diferentes cromosomas. Si tenemos en cuenta los trabajos con bandas G y los últimos con FISH, en general parece que el cromosoma 1 suele estar más implicado que los demás. Sin embargo los trabajos con FISH en los que se ha realizado un análisis más extenso de cromosomas Knehr y col. (1996), Barquinero y col. (1998) y el presente estudio Cigarrán y col. (1998), no se observa esta mayor implicación del cromosoma 1. Los resultados de nuestro estudio indican que el cromosoma 20 es el que está más implicado, pero quizás lo más significativo es la tendencia de los cromosomas grandes a estar menos implicados y los cromosomas pequeños a estar más implicados, tendencia que también se observa en un trabajo de Knehr y col. (1994) y en el de Barquinero y col., (1998), aunque en este último, básicamente en los cromosomas de tamaño pequeño.

Se ha sugerido que la estructura de la cromatina podría influir en la distribución de las alteraciones cromosómicas ya que, la accesibilidad de los mecanismos de reparación a la cromatina puede influir en la frecuencia de alteraciones cromosómicas. Surrallés y col. (1997), valoraron la heterogeneidad existente en la reparación a nivel cromosómico y comparando los resultados obtenidos en los cromosomas 1, 4, 18, 19 y 20 indican que los cromosomas de mayor densidad génica son reparados de manera preferencial. Además, Surrallés y col. (1998) sugieren que los cromosomas con mayor densidad génica, en caso de estar implicados en alteraciones teóricamente estables, tendrían mayor probabilidad de truncar o inactivar genes y esto por tanto podría influir en la persistencia de estas translocaciones a nivel celular. Puerto y col. (1999), realizaron un estudio en este sentido, para ello valoraron la persistencia de alteraciones

cromosómicas durante 56 días, analizando cromosomas de diferente tamaño y de densidad génica heterogénea. Los resultados indicaron que la persistencia de las translocaciones en el tiempo estudiado era independiente del tamaño del cromosoma y de la densidad génica. Atendiendo a nuestros resultados y considerando que la densidad génica es muy heterogénea en los cromosomas humanos, parece que este factor no adquiere un gran peso específico en la formación de alteraciones cromosómicas.

Uno de los factores a tener en cuenta cuando consideramos la inducción de alteraciones cromosómicas por las radiaciones ionizantes, es la localización y como se organizan los cromosomas en el núcleo interfásico. Folle y col. (1998) indicaron la posibilidad de que el hecho de que se produzca un mayor número de alteraciones cromosómicas en las bandas G claras, podría ser consecuencia de una organización especial de la cromatina en el núcleo. Savage y col. (1993), propusieron que los diferentes cromosomas se encuentran empaquetados en el núcleo ocupando unos determinados territorios. Sachs y col. (1993) considerando esta posibilidad, sugirieron que presumiblemente, el exceso de intercambios intracromosómico se deba a un efecto de proximidad espacial en el núcleo. Estos autores, además de apreciar un exceso de alteraciones en el cromosoma 1, observaron que los cromosomas pequeños presentaban un exceso de translocaciones, de forma que si esta tendencia fuese real podría implicar un efecto de superficie.

Con la utilización de las técnicas de pintado cromosómico se ha hecho cada vez más evidente que los cromosomas se organizan ocupando diferentes dominios o territorios en el núcleo. En 1996, Cremer y col, indicaron que cada cromosoma ocupa un territorio en el núcleo interfásico, y por tanto, la implicación de un determinado cromosoma en alteraciones tipo intercambio, podría estar correlacionada con el área de la superficie que ocupa su territorio en el núcleo. Estos autores, proponen diferentes modelos de territorios cromosómicos. En dos de ellos, el cilíndrico y el hexagonal, el área que ocupa el DNA de la superficie de cada cromosoma, es proporcional al contenido de DNA. Un tercer modelo, considera que los cromosomas tienen territorios esféricos, con un volumen proporcional a su contenido de DNA y una superficie cuya área es proporcional al (contenido de DNA)^{2/3}. Este último modelo de territorios cromosómicos esféricos ya había sido propuesto por Hlatky y col. (1992). Kreth y col. (1998) realizaron simulaciones computerizadas valorando cuatro modelos de organización de la cromatina en el núcleo. Dos modelos de organización no territorial (Comings (1968) y Vogel y Schroeder (1974)) y dos de organización territorial (Sachs y col. (1995) y subdominios esféricos propuesto por Munkel y col. (1995) y Cremer y col. (1996)). Compararon los datos obtenidos a partir de irradiaciones isotrópicas y de irradiaciones localizadas, con los datos esperados considerando los diferentes modelos. Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que los modelos territoriales eran los que se ajustaban mejor en los dos tipos de irradiación pero además observaron que la tasa de translocaciones mostraba una estrecha dependencia con el (contenido de DNA)^{2/3}.

En el presente trabajo (Cigarrán y col. 1998), las frecuencias de alteraciones tipo intercambio también se han ajustado mejor al $(\text{contenido de DNA})^{2/3}$. Recientemente Wu y col. (2001) han estudiado el efecto de la distancia de interacción entre DSB (roturas de cadena doble) sobre la frecuencia de intercambios intra e intercromosómicos en relación con el contenido de DNA. Estos autores apoyan nuestros resultados y presentan un modelo matemático para predecir la probabilidad de formación de un intercambio e indican que frente al contenido relativo de DNA, obtienen un mejor ajuste considerando la “área de la superficie de territorios esféricos” utilizado por nosotros (Cigarrán y col. 1998). Recientemente en nuestro laboratorio, se han obtenido resultados en los que de nuevo las frecuencias de alteraciones obtenidas en los cromosomas 1, 2, 3, 4, 7, 11 y 12, se ajustan mejor al $(\text{contenido de DNA})^{2/3}$ que únicamente al contenido de DNA.

Los resultados del presente trabajo junto a los datos procedentes de los trabajos arriba mencionados, hacen suponer que la frecuencia de alteraciones cromosómicas muestra una mejor correlación con el $(\text{contenido relativo de DNA})^{2/3}$ que con el contenido relativo de DNA. Si esto es cierto, tiene una gran importancia a la hora de elegir los cromosomas para realizar el pintado cromosómico, ya que la utilización de cromosomas grandes implicaría una infravaloración de la frecuencia genómica.

4.2.- Curvas dosis efecto con pintado cromosómico.

La aplicación de la técnica de pintado cromosómico en dosimetría biológica, parece *a priori*, útil en casos de dosimetría retrospectiva y para el estudio de poblaciones expuestas crónicamente a radiaciones ionizantes. Por ello, en los últimos años se han realizado numerosas curvas de calibración dosis efecto (Lucas y col. 1992, Bauchinger y col. 1993, Fernandez y col. 1995, Finnon y col 1995, Stephan y Pressl 1997, Lindholm y col. 1998, Barquinero y col. 1999, Knehr y col. 1999).

Uno de los inconvenientes que presenta la técnica de FISH es la nomenclatura a utilizar. La nomenclatura convencional es la que se utiliza en las curvas dosis efecto con dicéntricos y tinción uniforme, y por ello es la que inicialmente se empleó. La utilización de dicha nomenclatura pronto acarrió el problema de la interpretación de las alteraciones incompletas y de las alteraciones complejas, por ello se desarrollaron las nomenclaturas S&S (Savage y Simpson 1994a,b) y PAINT (Tucker y col. 1995a). Pero estas nuevas nomenclaturas no acabaron de solucionar el problema, ya que la nomenclatura PAINT no tiene en cuenta como se forman las alteraciones, y por tanto considera por igual una translocación producto de una reorganización simple que una producto de una reorganización compleja. La nomenclatura S&S, si bien considera los aspectos mecanísticos, es más complicada de aplicar y no incluye inicialmente las alteraciones incompletas, pudiéndose aplicar solo si se realiza la hibridación de un solo cromosoma o bien de diferentes cromosomas pero con sondas marcadas con diferentes fluorocromos. Una alternativa, la denominada "PAINT modificada", propuesta por Knehr y col. (1998), combina ambas nomenclaturas, de forma que se consideran los aspectos mecanísticos de la formación de las alteraciones, conservando además la ventaja descriptiva de la nomenclatura PAINT.

Mediante la aplicación de las técnicas de FISH, es relativamente frecuente observar alteraciones aparentemente incompletas. Stephan y Pressl (1997) obtienen un promedio de translocaciones incompletas de $17,4 \pm 9$, Lindholm y col. (1998b) del $28,1 \pm 12,0$ y en nuestro trabajo el porcentaje es del $27,3 \pm 7,1$. Cabe señalar que parte de las diferencias se deben a que incluyen en la categoría de alteraciones incompletas algunas alteraciones complejas, por ejemplo, 2G (S&S) que corresponde a un dicéntrico bicoloreado y un monocéntrico bicoloreado, que desglosan en un dicéntrico y translocación incompletos. Las translocaciones incompletas representa un factor de inestabilidad para la célula por lo que no son alteraciones perdurables en el tiempo. El hecho de considerar o no las translocaciones incompletas es una de las cuestiones que permanecen en discusión. Sin embargo, los últimos trabajos parecen indicar que las translocaciones incompletas observadas con pintado cromosómico podrían no ser realmente incompletas. Fernández y col. (1995) ya apuntaban la posibilidad de que algunas translocaciones incompletas involucraran

regiones teloméricas y que sencillamente la técnica de FISH no permite visualizarlas. El tamaño mínimo de una porción pintada, para que se pueda detectar es de $11.1 \pm 0,8$ Mb, mientras que para las porciones no pintadas es de $14.6 \pm 0,6$ Mb, Kodama y col. (1997). Aplicando sondas panteloméricas Boei y col. (1998) observaron que más del 85% de las alteraciones incompletas son el resultado de intercambios terminales. Wu y col. (1998) estiman que las alteraciones verdaderamente incompletas solo representan aproximadamente el 3%, y Fomina y col. (2000) sostienen que solo un 5% de alteraciones incompletas son verdaderas. Lindholm y col. (1998a), estudiando la persistencia de translocaciones en 5 casos de sobreexposición a radiaciones ionizantes, a los que se les realizó un seguimiento de la frecuencia de translocaciones completas e incompletas durante 2 años, observaron que la frecuencia de translocaciones no descendió de manera significativa y solamente en uno de los 5 casos se pudo constatar un descenso significativo de la frecuencia de translocaciones incompletas. Bauchinger y col. (2001) tampoco aprecian un descenso significativo en las translocaciones incompletas respecto a las translocaciones completas en estos mismos individuos. Todo esto parece indicar que la mayoría de translocaciones incompletas serían completas y debería considerarse la posibilidad de tenerlas en cuenta.

Al igual que las alteraciones incompletas, las alteraciones complejas (formadas por un mínimo de tres roturas en dos o más cromosomas), pueden dar lugar a pérdidas de material genético y por tanto provocar inestabilidad, por lo que el análisis de este tipo de alteraciones no es útil en dosimetría retrospectiva. En nuestro trabajo hemos obtenido unas frecuencias de alteraciones complejas respecto al total de alteraciones que oscilan desde 0 al 18%, frecuencias que son dependientes de la dosis. Resultados similares se han descrito en otros estudios (Finnon y col 1995 y Lindholm y col. 1998b). Simpson y Savage (1996) y Simpson y col. (1999) observaron que las alteraciones simples muestran una relación lineal con la dosis y que las alteraciones complejas una relación curvilínea. Edwards y col. (1999) también confirmaron que las alteraciones complejas aumentan más que linealmente con la dosis y además, al igual que en los trabajos de Simpson y col (1996 y 1999), observaron que las alteraciones complejas aumentan con la dosis así como la complejidad de las mismas. Sorokine-Durm y col. (1997), han encontrado alteraciones complejas "in vivo" en individuos que han sufrido accidentes a bajas dosis de radiación. En este sentido, Bauchinger y col. (2001) observaron células con alteraciones complejas durante por lo menos 1 año en un caso de exposición accidental a radiaciones ionizantes, por lo que la persistencia a lo largo del tiempo de este tipo de alteraciones se ha de estudiar con mayor profundidad. Knehr y col. (1999) proponen que el tipo de alteración más adecuada en dosimetría retrospectiva es la alteración 2B (S&S) que son las translocaciones completas (nomenclatura convencional), es decir, las translocaciones recíprocas o completas pudiéndose incluir también las translocaciones incompletas tipos I, II y III (S&S) pero que no procedan de alteraciones complejas. En este sentido, Finnon y col. (1999) recomiendan para dosimetría retrospectiva el análisis de translocaciones

aparentemente simples pero sólo en células sin alteraciones inestables.

Otro aspecto a destacar y a tener en cuenta en la elaboración de curvas dosis-efecto con FISH, es que a diferencia de lo que ocurre con la frecuencia basal de cromosomas dicéntricos, la frecuencia de translocaciones en individuos control es elevada. Esta tasa de translocaciones es posiblemente la causa de que la relación t/dic sea superior a 1 en los cuatro primeros puntos de la curva. A dosis bajas, el coeficiente lineal de la curva () es el que adquiere mayor peso específico. Para disminuir el nivel de incertidumbre provocado por esta elevada frecuencia basal de translocaciones, es importante analizar un número muy elevado de células a dosis bajas y analizar un número elevado de puntos de dosis por debajo de 2Gy. En nuestras curvas se han valorado 6 puntos de dosis por debajo de 2 Gy (0.1 y 1.5 Gy) y se han analizado 14.239 células que son aproximadamente un 52% del total lo que permitió obtener un error aceptable para el coeficiente .

Al comparar las diferentes curvas con FISH, se observa que las curvas de translocaciones completas y totales son significativamente diferentes a las de dicéntricos completos y totales siendo la frecuencia basal el factor que más influye en estas diferencias. También existe diferencia significativa entre la curva de dicéntricos completos y la curva de dic (BA), aunque en este caso el factor es el que mayor peso aporta a estas diferencias ya que es superior en la curva de dic (BA) (Tabla 4, pág. 36). Esto se debe a que se incluyen todas las células que presentan dicéntricos completos (dic (BA) ace (ab) nomenclatura PAINT) más los dicéntricos incompletos del tipo IV y VI, que son más frecuentes a dosis altas, probablemente como consecuencia de la presencia de alteraciones complejas. También por este motivo la curva dic (BA) se asemeja a la curva de dicéntricos con tinción uniforme, en la cual se contabilizan todos los dicéntricos, incluidos los procedentes de alteraciones complejas. En el caso de las translocaciones, la curva de translocaciones totales tiene los coeficientes lineal () y cuadrático (), superiores a los de las curvas $t(ba)$ y $t(Ab)$, lo que probablemente motive la diferencia significativa entre ellas (Tabla 4, pág. 36, Figuras 3 y 4 pág. 37 y 38). Como en el caso anterior, la diferente forma de clasificar las translocaciones como consecuencia de los criterios definidos por las diferentes nomenclaturas, es lo que origina dichas diferencias. Así por ejemplo la diferencia entre la curva de translocaciones totales y la de $t(Ba)$ se explicaría porque en la primera, se incluyen todas las alteraciones que considera la curva $t(Ba)$ más las translocaciones incompletas del tipo $t(Ab)$ (Tabla 1 pág 12). Podríamos por tanto decir que las curvas de translocaciones utilizando la nomenclatura convencional parecen más adecuadas que las curvas de translocaciones con nomenclatura PAINT.

4.3.- Población ocupacionalmente expuesta a bajas dosis de radiaciones ionizantes.

En individuos irradiados accidentalmente dos o tres meses antes del análisis, la dosimetría biológica se puede realizar mediante el estudio de la frecuencia de dicéntricos. Pero si transcurre un tiempo superior, la estimación se debe llevar a cabo preferentemente mediante el análisis de translocaciones. Las translocaciones al ser más perdurables en el tiempo que los dicéntricos, también son útiles en la estimación de dosis recibidas a consecuencia de exposiciones crónicas a radiaciones ionizantes. La frecuencia basal de translocaciones en individuos no irradiados es superior y más variable que la de dicéntricos (1-2 dicéntricos por 1000 células). Para estimar la dosis de una posible sobreexposición antigua o crónica mediante el análisis de la frecuencia de translocaciones, se debe establecer la frecuencia basal de translocaciones en una población control.

La población control del presente estudio está compuesta de 18 individuos (11 varones y 7 mujeres) sanos, sin historial de exposición a agentes mutágenos, excepto algunos casos de fumadores, y se han analizado un total de 26.611 células. La frecuencia genómica de translocaciones totales por 100 células (\pm SE) ha sido de $0,90 \pm 0,12$, seis veces superior a la frecuencia genómica de dicéntricos totales $0,15 \pm 0,04$. A continuación se resumen algunos de los resultados sobre la frecuencia basal de translocaciones con FISH:

- Tucker y col. (1994a), analizaron una población de 47 individuos de los que estudiaron 161.832 células, obteniendo una frecuencia basal de translocaciones y dicéntricos de $0,46 \times 10^{-2}$ y $0,03 \times 10^{-2}$ respectivamente.
- Bauchinger y col. (1996), obtuvieron una frecuencia similar de translocaciones y dicéntricos de $0,45 \times 10^{-2}$ y $0,04 \times 10^{-2}$ respectivamente, estudiando una población de 32 individuos y analizando 34.340 células.
- Snigiryova y col. (1997), analizaron 13.586 células de 12 individuos y la frecuencia de translocaciones y dicéntricos fue de $0,30 \times 10^{-2}$ y de $0,00 \times 10^{-2}$ respectivamente.
- Tucker y col. (1997), realizaron un estudio de dosimetría biológica en una población de trabajadores de la "Sellafield Nuclear Facility". Para este estudio utilizaron una población control formada por 23 trabajadores con dosis acumuladas por debajo de 50 mSv, la frecuencia de translocaciones y dicéntricos en este caso fue de $0,74 \times 10^{-2}$ y de $0,16 \times 10^{-2}$ respectivamente.
- Littlefield y col. (1998), estudiaron dos poblaciones control diferentes, una formada por 29 varones procedentes de Estonia y otra por 21 individuos norteamericanos. Las frecuencias de translocaciones y dicéntricos totales en las poblaciones de Estonia y de U.S.A, fueron de $0,70 \times 10^{-2}$ y $0,13 \times 10^{-2}$ y de $0,68 \times 10^{-2}$ y $0,05 \times 10^{-2}$ respectivamente. Para translocaciones

completas las frecuencias fueron $0,44 \times 10^{-2}$ y $0,37 \times 10^{-2}$ en las poblaciones de Estonia y U.S.A. respectivamente.

- Pressl y col. (1999), analizaron 120.000 células de una población de 42 individuos, y obtuvieron unas frecuencias de translocaciones y dicéntricos totales de $0,72 \times 10^{-2}$ y $0,06 \times 10^{-2}$ respectivamente; para translocaciones completas la frecuencia fue de $0,50 \times 10^{-2}$.
- Lucas y col. (1999), analizaron 521.492 células de 35 individuos, y encontraron una tasa de translocaciones totales de $0,40 \times 10^{-2}$.

Recientemente Tawn y col. (2001) valoraron la frecuencia basal de translocaciones mediante bandas G en una población de 162 hombres y estudiando 12.350 células y obtuvieron una frecuencia de translocaciones por 100 células (\pm SE) de $0,75 \pm 0,08$. Esta frecuencia es similar a la de los estudios de Littlefield y col. (1998), Tucker y col. (1997), y Pressl y col. (1999), y se acerca a la frecuencia encontrada en nuestro estudio, (Cigarrán y col. 2001). Las similitudes observadas cuando se comparan las frecuencias basales de translocaciones totales a nivel poblacional, contrastan con las diferencias encontradas si se comparan estudios en los que solamente se analizan 1 o 2 individuos: $0,22 \times 10^{-2}$ (Fernández y col. 1995); $1,06 \times 10^{-2}$ (Finnon y col. 1995); $0,31 \times 10^{-2}$ (Stephan y col. 1997); y $0,90 \times 10^{-2}$ (Lindholm y col. 1998b). En nuestro trabajo hemos encontrado un gran rango de variación en las frecuencias de translocaciones entre los individuos (de 0,20 a 1,92 translocaciones totales por 100 células), pese a estas diferencias la población muestra homogeneidad. Del análisis de esta población control, se han de destacar las alteraciones halladas en dos individuos. El individuo C5 presentaba una elevada frecuencia de alteraciones cromosómicas, como consecuencia de que dos células presentaban alteraciones complejas. En el individuo C11, se observaron dos células con una [inv(1)], demostrándose posteriormente mediante bandas DAPI, que se trataba de una alteración clonal. Lucas y col. (1999) observaron que la frecuencia de alteraciones clonales era superior en individuos de más de 60 años, y que es necesario eliminar estas alteraciones del cómputo global a fin de no contaminar la frecuencia basal con las alteraciones ocasionadas por efecto de la expansión clonal de linfocitos. La presencia de individuos "atípicos" ha sido descrita en seis de ocho estudios sobre poblaciones control realizados por diferentes grupos en los que se encontraron individuos con elevadas frecuencias de alteraciones que podían ser responsables de la heterogeneidad observada (Sorokine-Durm y col. 2000).

La persistencia y acumulación de alteraciones estables como las translocaciones simétricas y las inserciones, posibilita que la frecuencia de este tipo de alteraciones se pueda correlacionar con la edad del individuo. Sin embargo, los estudios realizados con técnicas de pintado cromosómico, revelan resultados discordantes.

- ❑ Tucker y col. (1994a) observaron una relación lineal cuadrática entre las frecuencias de translocaciones y la edad, sin embargo, en 1997 los mismos autores, estudiando los trabajadores de la “Sellafield Nuclear Facility”, con edades comprendidas entre 40 y 72 años, no hallaron correlación con la edad.
- ❑ Pressl y col. (1999), estudiaron 42 individuos de edades entre 21 y 73 años, y encontraron una correlación entre las frecuencias de translocaciones y la edad. Es de destacar que la frecuencia de translocaciones que presentaban los individuos cuyas edades superan los 60 años, era 3 veces superior a la de los individuos menores de 40 años.
- ❑ Lucas y col. (1999), describen una relación lineal cuadrática entre translocaciones y la edad en una población de edades comprendidas entre 0 y 98 años, y postulan que es debido a que además de las radiaciones ionizantes, existen otros agentes clastogénicos que provocarían este aumento.
- ❑ Littlefield y col. (1998), por el contrario, no detectaron aumento en la frecuencia de translocaciones con la edad, en ninguna de las dos poblaciones control estudiadas.
- ❑ Sorokine-Durm y col. (2000), sólo en tres (entre los que se encuentra el de Pressl y col. 1999) de los ocho estudios que recopilan, observaron una correlación con la edad. Sin embargo, al acumular los datos de los ocho estudios, si que aprecian una correlación significativa entre la frecuencia de translocaciones totales y la edad.

En el trabajo de Tawn y col. (2001) con bandas G, también se observa una correlación entre la edad y la frecuencia de translocaciones. Al agrupar la frecuencia de translocaciones por grupos de edad se observan frecuencias de translocaciones similares a las descritas por Sorokine-Durm y col. (2000). Tal y como indican Pressl y col., (1999), Tawn y col. (2001) y como se deduce de los datos de Sorokine-Durm y col. (2000) en edades superiores a los 60 años es donde se produce el mayor aumento en la frecuencia de translocaciones. Por tanto, para detectar una correlación entre la edad y la frecuencia de translocaciones, se necesita estudiar un amplio rango de edades. En nuestro estudio, tanto en la población control como en la población ocupacionalmente expuesta no se ha observado correlación entre la frecuencia de translocaciones y la edad, posiblemente debido al rango de edad (25 a 59 años) de la muestra, y al bajo número de individuos de más de 50 años estudiados.

Moore y Tucker (2000), indican que si no se tuviera en cuenta la edad y el hábito de fumar en su estudio sobre “clean-up workers” de Chernobil, las dosis hubieran sido sobrestimadas. Los resultados obtenidos en diferentes trabajos respecto a la posibilidad de que el efecto del tabaco se detecte a nivel citogenético son discordantes. Obe y col. (1982); Tawn y Cartmell (1989) y Ganguly (1993), en estudios con técnicas de tinción uniforme, observaron una tasa de dicéntricos doble en individuos fumadores al compararlos con no fumadores. Bender y col. (1988), por el contrario no encontraron diferencias en la frecuencia de dicéntricos entre fumadores y no fumadores. Tawn y

col. (2001), en este caso con bandas G encontraron que la frecuencia de translocaciones e intercambios simétricos es significativamente superior en fumadores. Utilizando técnicas de FISH y analizando frecuencias de distintas alteraciones cromosómicas, también se han descrito resultados diferentes. Van Diemen y col. (1995), estudiaron 30 individuos no fumadores y 12 fumadores, y observaron una mayor frecuencia de hiperdiploidías en individuos fumadores, sin embargo, no encontraron diferencias significativas en las alteraciones cromosómicas estructurales. Tucker y col. (1997), tampoco observaron relación entre la frecuencia de translocaciones y el hábito de fumar. Por el contrario, Ramsey y col. (1995), observaron que, el hábito de fumar, estaba asociado a una mayor frecuencia de alteraciones estables. Lo más destacable de este último estudio, es que el nivel de translocaciones detectado en los recién nacidos de mujeres fumadoras fue significativamente superior al de los neonatos de las mujeres no fumadoras. Del mismo modo, Littlefield y col. (1998), observaron que los individuos fumadores mostraban un incremento en la frecuencia de translocaciones. También se ha descrito una ligera asociación entre la frecuencia de translocaciones y el tabaco, pero solo en los individuos que fumaban más de 30 cigarrillos al día Pressl y col. (1999). En relación con el hábito de fumar, en ninguna de las dos poblaciones estudiadas en nuestro trabajo, se apreciaron diferencias en las frecuencias de translocaciones completas ni totales, entre individuos fumadores y no fumadores.

En nuestro trabajo se ha realizado dosimetría biológica en una población ocupacionalmente expuesta a muy bajas dosis de radiación ionizante. Se trata de 20 trabajadores de los servicios de radiodiagnóstico (rayos X), radioterapia y medicina nuclear (rayos γ) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona y con un periodo de exposición desde 4 hasta 26 años, y una dosis media acumulada de 38,1 mSv. En esta población la frecuencia de translocaciones fue ligeramente superior, aunque no estadísticamente significativa, a la de la población control. La estimación de la dosis con las curvas de FISH en el conjunto de los individuos, se realizó teniendo en cuenta el factor lineal de la curva y se obtuvo una estimación de 38 mSv (con la curva de translocaciones completas) y de 21 mSv (con la curva de translocaciones totales). Sin embargo, los límites de confianza del 95% de esta estimación incluyen la dosis 0. A nivel individual no se pudo establecer correlación entre la frecuencia de translocaciones ni con la dosis acumulada ni con la dosis aguda equivalente. Por lo tanto concluimos que con las técnicas de FISH es difícil detectar exposiciones crónicas, al menos a las dosis de radiación a las que ha estado expuesta la población estudiada.

De las diversas investigaciones con técnicas de FISH para valorar posibles exposiciones crónicas a radiaciones ionizantes en diferentes poblaciones, en algunos casos se han podido estimar las dosis recibidas a nivel poblacional, sin embargo, la determinación individual de la dosis no siempre ha sido posible.

Salomaa y col. (1997), estudiaron una población de 50 personas que habitan un área contaminada por el accidente de Chernobil. Tal como sucede con nuestros resultados, la frecuencia de translocaciones en la población del área contaminada, fue superior aunque no de forma significativa a la de la población control.

Bauchinger y col. (1998b) estudiaron 73 individuos de una población residente en la ribera del río Techa (Rusia). Se trata de un área contaminada por el derrame al río de sustancias radiactivas procedentes de la central nuclear de Mayak. En este estudio encontraron una frecuencia significativamente superior a la de la población control y estimaron una dosis colectiva de unos 240 mGy. Sin embargo, la dosis individual solo se pudo establecer en unos pocos individuos que mostraron un número suficientemente elevado de translocaciones.

Stephan y col. (2001), estudiaron 10 habitantes del pueblo de Dolon (Rep. Kazajastán), un área contaminada por pruebas militares con armamento nuclear desde 1949 hasta 1989. La dosis física efectiva calculada era de alrededor de 3 Sv, sin embargo las frecuencias de translocaciones con técnicas de FISH, eran muy bajas y no diferían de las de la población control, por lo que los autores creen que la dosis física establecida era demasiado elevada. Sin embargo, encontraron un incremento significativo de alteraciones complejas, que asocian a la incorporación de radionúclidos.

Bauchinger y col. (1996), en un estudio sobre exposición crónica ambiental a radiación ionizante en 25 residentes de edificios con elevada concentración de Radón, no encontraron un incremento significativo en la frecuencia de translocaciones. En este estudio se indica la posibilidad de que la dosis efectiva en la médula ósea sea demasiado baja para mostrar un efecto en la frecuencia de translocaciones en linfocitos. Además se apunta que las alteraciones cromosómicas inducidas por las partículas alfa pueden ser letales para la célula y por tanto no se transmitirían a los linfocitos circulantes.

Lindholm y col. (1999), estudiaron 84 personas no fumadoras de 4 poblaciones de Finlandia y que habitan en viviendas con radiación ambiental procedente del Radón. Realizaron un estudio comparativo, categorizando tres grupos que correspondían a tres niveles de concentración de Radón (baja, media y alta), con unas tasas de dosis anual de 0,83, 0,99 y 1,17 mSv respectivamente. En este trabajo, no se observó correlación entre las frecuencias de translocaciones y la exposición al Radón y concluyen que la dosis procedente de las partículas alfa derivadas de la desintegración del ^{222}Rn , no es suficiente para inducir un número suficiente de alteraciones.

Snigiryova y col. (1997) realizaron un estudio en 52 "clean-up workers" de Chernobil, 35 de los cuales presentaban dosis entre 12 y 800 mSv. La frecuencia de translocaciones en el conjunto de los individuos fue significativamente superior a la de la población control. Además obtuvieron una buena estimación de la dosis recibida por el grupo de trabajadores que estuvieron durante diferentes años trabajando en la zona (250 mGy) y de los que se disponía información sobre la dosis recibida (260 mSv). Sin embargo, no encontraron una clara dependencia entre las dosis documentadas y la frecuencia de translocaciones.

Littlefield y col. (1998) también estudiaron una población de "clean-up workers" de Chernobil. Concretamente estudiaron 118 individuos que recibieron una dosis media de 103 mGy (máx. 250 mGy). En este trabajo la frecuencia de translocaciones fue inferior, aunque no significativamente, a la del grupo control, y tampoco encontraron correlación entre la frecuencia de translocaciones y la dosis.

Bauchinger y col. (1997) evaluaron una exposición ocupacional en 7 trabajadores de la industria nuclear que recibieron una dosis media de 247 mSv. En esta población encontraron que la frecuencia de translocaciones con FISH, así como la frecuencia de dicéntricos más anillos fueron significativamente más elevadas que las de la población control y pudieron hacer una estimación de la dosis en el conjunto de los individuos de 270 mSv.

La exposición ocupacional a radiaciones ionizantes incluye generalmente bajas dosis de radiación ionizante. Este tipo de exposición permite disponer de una monitorización individual del personal mediante dosímetros físicos. Tucker y col. (1997) estudió 55 trabajadores de la planta nuclear de Sellafield (G.B) y encontraron una clara correlación entre la frecuencia de translocaciones y la dosis acumulada. La dosis acumulada de la mayoría de individuos estaba por encima de los 500 mSv, sin embargo encontraron variaciones sustanciales a nivel individual, por lo que en esta población la dosimetría sólo se pudo llevar a cabo para el conjunto de individuos.

La posible persistencia y acumulación de las translocaciones en el tiempo, hace que sean útiles en la estimación de dosis recibidas a consecuencia de exposiciones crónicas a radiaciones ionizantes. Sin embargo, la elevada y variable frecuencia basal de translocaciones dificultan la estimación a bajas dosis, tal y como se desprende de nuestros resultados y de los estudios en poblaciones expuestas crónicamente a radiaciones ionizantes.

Se puede por tanto concluir que es difícil poder apreciar diferencias significativas en las frecuencias de translocaciones mediante FISH, si la dosis está por debajo de los 250-300 mSv. Asimismo la estimación individual de bajas dosis es prácticamente imposible y solo se ha podido

llegar a determinar en algunos casos donde la frecuencia de translocaciones fue elevada.

5.- CONCLUSIONES.

1. Los cromosomas de tamaño mayor muestran frecuencias de alteraciones tipo intercambio por debajo de lo esperado según su contenido relativo de DNA, mientras que los cromosomas pequeños muestran frecuencias de alteraciones tipo intercambio por encima de lo esperado según su contenido relativo de DNA.
2. La frecuencia observada de alteraciones tipo intercambio en los diferentes cromosomas humanos, se ajusta bien a las frecuencias esperadas según el (contenido relativo DNA)^{2/3}. Esta relación puede ser debida a que en el núcleo interfásico, cada cromosoma ocupa un territorio aproximadamente esférico.
3. Debido a la elevada y variable frecuencia basal de translocaciones, para conseguir un buen ajuste del coeficiente lineal en la elaboración de curvas dosis-efecto mediante FISH, es necesario analizar un número muy elevado de células en las dosis bajas.
4. La estimación de la dosis de una exposición a radiaciones ionizantes a corto plazo mediante la utilización de las diferentes curvas dosis-efecto con FISH, no debería mostrar diferencias importantes con la estimación realizada mediante la curva dosis-efecto de dicéntricos con tinción uniforme. Sin embargo, para dosimetría retrospectiva las curvas dosis-efecto más útiles son las de translocaciones completas y totales.
5. En el estudio de las poblaciones control y ocupacionalmente expuesta a radiaciones ionizantes, no se ha encontrado relación entre la frecuencia de alteraciones cromosómicas y la edad, debido probablemente al estrecho rango de edades en estas poblaciones. Tampoco se ha encontrado relación entre la frecuencia de alteraciones cromosómicas y el hábito de fumar.
6. No se han observado diferencias significativas entre la población ocupacionalmente expuesta y la población control para las frecuencias de las diferentes alteraciones cromosómicas detectadas.
7. La elevada y variable frecuencia basal de translocaciones y las bajas dosis recibidas por la población ocupacionalmente expuesta, provoca que no se encuentre correlación entre las dosis individuales registradas y la frecuencia de translocaciones, lo que impide la estimación de la dosis individual.
8. La dosis estimada en el conjunto de individuos es de 38 y 21 mGy para translocaciones completas y totales respectivamente, y se ha aproximado a las dosis registradas mediante

dosímetros físicos en la población ocupacionalmente expuesta (38.1 y 10 mSv de dosis media acumulada y aguda equivalente respectivamente). No obstante, el intervalo de confianza del 95% para translocaciones incluyó siempre la dosis 0.

6.- BIBLIOGRAFÍA

- Al-Sabti K., Lloyd D.C., Edwards A. A., Stegnar P. A survey of lymphocyte chromosomal damage in Slovenian workers exposed to occupational clastogens. *Mutat. Res.* 280, 215-223, **1992**.
- Awa, A.A., Sofuni, T., Honda, T., Itoh, M., Neriishi, S. Otake, M. Relationship between the radiation dose and chromosome aberrations in atomic bomb survivors of Hiroshima and Nagasaki. *Int. J. Radiat. Biol.* 19,126-140, **1978**.
- Balakrishnan S., Rao B. Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of occupational workers exposed to low levels of ionising radiation. *Mutat. Res.* 402, 37-42, **1999**.
- Barquinero J.F., Barrios L., Caballín M.R., Miró R., Ribas M., Subias A., Egozcue J. Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutat. Res.* 286, 275-279, **1993**.
- Barquinero, J.F., Barrios, L., caballin, M.R., Miro, R., Ribas, M. Egozcue, J. Biological dosimetry in simulated *in vitro* partial irradiations. *Int. J. Radiat. Biol.* 71,435-440, **1997**.
- Barquinero J. F., Knehr S., Braselmann H., Figel M. Bauchinger M. DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence *in situ* hybridisation (FISH)-painting of all chromosomes of a human female karyotype. *Int. J. Radiat. Biol.* 74, 315-323, **1998**.
- Barquinero J. F., Cigarrán S., Caballín M.R., Braselmann H., Ribas M., Egozcue J. Barrios L. Comparison of X-ray dose-response curves obtained by chromosome painting, using conventional and paint nomenclatures. *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 1557-1566, **1999**.
- Barrios L., Miró R., Caballín M.R., Fuster C., Guedea F., Subias A., Egozcue E. Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations. *Can. Genet. Cytogenet.* 41, 61-70, **1989**.
- Bauchinger M., Götz G. Distribution of radiation induced lesions in human chromosomes and dose-effect relation analysed with G-banding. *Radiat. and Envir. Biophys.* 16, 355-366, **1979**.
- Bauchinger M., Kolin-Genesheimen J., Schmid E., Dresch J. Chromosome analysis of nuclear power plant workers. *Int. J. Radiat. Biol.* 38, 577-581, **1980**.
- Bauchinger M., Eckerl H., Drexler G., Streng S., Schmid E. Chromosome dosimetry and occupational radiation exposure. *Radiat. Protect. Dosim.* 2, 93-97, **1984**.
- Bauchinger M., Schmid E., Braselmann H., Willich N. Clemm C. Time-effect relationship of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes after radiation therapy for seminoma. *Mutat. Res.* 211, 265-272, **1989**.
- Bauchinger M., Schmid E., Zitzelsberger H., Braselmann H. Nahrstedt, U. Radiation-induced chromosome aberrations analyzed by two-colour fluorescence *in situ* hybridization with composite whole chromosome-specific DNA-probes and a pancentromeric DNA-probe. *Int. J. Radiat. Biol.* 64,179-184, **1993**.

- Bauchinger M., Braselmann H., Kulka U., Huber R., Georgiadou-schumacher V. Quantification of FISH-painted chromosome aberrations after domestic radon exposure. *Int. J. Radiat. Biol.* 70, 657-663, **1996**.
- Bauchinger M., Schmid E., Braselmann H. Cytogenetic evaluation of occupational exposure to external γ -rays and internal ^{241}Am contamination. *Mutat. Res.* 395, 173-178, **1997**.
- Bauchinger M., Salassidis K., Braselmann H., Voziliva A., Pressl S., Stephan G., Snigiryova G., Kozherov V.P., Akleyev A. FISH-based analysis of stable translocations in a Techa River population. *Int. J. Radiat. Biol.* 73, 605-612, **1998**.
- Bauchinger M. Retrospective dose reconstruction of human radiation exposure by FISH-chromosome painting. *Mutat. Res.* 404, 89-96, **1998**.
- Bauchinger M.; Schmid E., Braselmann H. Time-course of translocation and dicentric frequencies in a radiation accident case. *Int. J. Radiat. Biol.* 77, 553-557, **2001**.
- Bender M.A., Gooch P.C. Somatic chromosome aberration induced by human whole-body irradiation: The "Recuplex" critically accident. *Radiat. Res.* 29, 68-82, **1966**.
- Bender M.A., Preston R.J., Leonard R.C., Pyatt B.E., Gooch P.C., Shelby M.D. Chromosomal aberration and sister chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. *Mutat. Res.* 204, 421-433, **1988**.
- Beninson D., Lloyd D.C., Natarajan A.T., Obe G., Preston R.J., Sasaki M.S. Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment. *Technical Reports Series no. 260 (Vienna:IAEA)*, **1986**.
- Bigatti P., Lamberti L., Ardito G., Armelino F. Cytogenetic monitoring of hospital workers exposed to low-levels of ionizing radiation. *Mutat. Res.* 204, 343-347, **1988**.
- Boei J.J.W.A., Vermeulen S., Fomina J., Natarajan A.T. 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**.
- Bryant P.E. DNA damage, repair and chromosomal damage. *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 675-680, **1997**.
- Buckton K. E., Smith P.G., Court Brown W.M. Lymphocyte survival in men treated with X-rays for ankylosing spondylitis. *Nature.* 214, 470-473, **1967**.
- Buckton K. E., Hamilton, G.E., Paton, L., Langlois, A. O. Chromosome aberrations in irradiated ankylosing spondylitis patients, in H.J. Evans and D.C. Lloyd (Eds.), *Mutagen-induced chromosome damage in man*, University Press, London, pp142-150, **1978**.
- Buckton K. Chromosome aberrations in patients treated with X irradiation for ankylosing spondylitis. *Radiation Induced Chromosome Damage in Man*, Ed. T. Ishihara, S. Sasaki (New York: Alan R. Liss) pp,491-511, **1983**.
- Catcheside D.G., Lea D.E., Thoday J.M. The production of chromosome structural changes in *Tradescantia* microspores in relation to dosage, intensity and temperature. *J. Genet.* 47,137, **1946**.

- Chadwick K.H., Leenhouts H.P. The rejoining of DNA double strand-breaks and a model for the formation of chromosomal rearrangements. *Int. J. Radiat. Biol.* 33, 517-519, **1978**.
- Chadwick K.H., Leenhouts H.P. The Molecular Theory of Radiation Biology. *Springer-Verlag, Berlin*, **1981**.
- Chung H.W., Ryu E.K., Kim Y.J., Ha S.W. Chromosome aberrations in workers of nuclear-power plants. *Mutat. Res.* 350, 307-314, **1996**.
- Cigarrán S., Barrios L., Barquinero J.F., Caballín M.R., Ribas M., Egozcue J. 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**.
- Cigarrán S., Barquinero J.F., Barrios L., Ribas M., Egozcue J., Caballín M.R. Cytogenetic analyses by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing Radiation. *Radiat. Res.* 155, 417-423, **2001**.
- Cremer C., Münkler Ch., Granzow M., Jauch A., Dietzel S., Eils R., Guan X-Y., Meltzer P.S., Trent J.M., Langowski J. Cremer T. Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 366, 97-116, **1996**.
- Comings D.E. The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. *Am. J. Hum. Genet.* 20, 440-460, **1968**.
- Edwards, A.A. The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry. *Radiat. Res.* 148, S39-S44, **1997**.
- Edwards A.A., Hone P.A., Moquet J.E., Lloyd D. C. Simple chromosome exchanges are not lineal with dose. *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 1113-1117, **1999**.
- Edwards, A.A. Editorial- Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH). *Radiat. Prot. Dosim* 88, 5-6, **2000**.
- Evans H.J., Buckton K.E., Hamilton G.E., Carothers A. Radiation-induced chromosome aberrations in nuclear-dockyard workers. *Nature.* 277, 531-534, **1979**.
- Fernandez J.L., Campos A., Goyanes V., Losada C., Veiras C. Edwards A.A. X-ray biological dosimetry performed by selective painting of human chromosomes 1 and 2. *Int. J. Radiat. Biol.* 67, 295-302, **1995**.
- Finnon P., Lloyd D.C. Edwards A.A. Fluorescence *in situ* hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.* 68, 429-435, **1995**.
- Finnon P., Moquet J.E., Edwards A.A., Lloyd D.C. The ⁶⁰Co gamma ray dose-response for chromosomal aberrations in human lymphocytes analysed by FISH; applicability to biological dosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 1215-1222, **1999**.
- Folle G.A., Martínez-López W., Boccardo E., Obe G., Localization of chromosome breakpoints: implication of the chromatin structure and nuclear architecture. *Mutat. Res.* 404, 17-26, **1998**.

- Fomina J., Darroudi F., Boei J.J.W.A., Natarajan A.T. Discrimination between complete and incomplete chromosome exchanges in X-irradiated human lymphocytes using FISH with pancentromeric and chromosome specific DNA probes in combination with telomeric PNA probe. *Int. J. Radiat. Biol.* 76, 807-813, **2000**.
- Ganguly B.B. Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral lymphocytes of healthy donors: related to donor's age. *Mutat. Res.* 295, 135-148, **1993**.
- Gebhart E., Neubauer S., Schmitt G., Birkenhake S., Dunst J., Use of a three-color chromosome in situ suppression technique for the detection of past radiation exposure. *Radiat. Res.*, 145, 47-52, **1996**.
- Goodhead D.T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 7-17, **1994**.
- Granath F., Grigoreva M., Natarajan A.T. DNA content proportionality and persistence of radiation-induced chromosomal aberrations studied by FISH. *Mutat. Res.* 366, 145-152, **1996**.
- Hlatky L., Sachs R., Hahnfeldt P. The ratio of dicentrics to centrics rings produced in human lymphocytes by acute low-LET irradiation. *Radiat. Res.* 129, 304-308, **1992**.
- I.C.R.P.-60 Recommendations of the International Commission on Radiobiological protection. *Annals of I.C.R.P. Pergamon press Oxford.* **1990**.
- ISCN, An international System for Human Cytogenetic Nomenclature, edited by F. Mitelman (Basel / New York: S. Karger) pp:1-117, **1995**.
- Jha A.N., Sharma T. Enhanced frequency of chromosome aberrations in workers occupationally exposed to diagnostic X-rays. *Mutat. Res.* 260, 343-348, **1991**.
- Johnson K.L., Tucker J.D., Nath J. Frequency, distribution and clonality of chromosome damage in human lymphocytes by multi-color FISH. *Mutagenesis.* 13, 217-22, **1998**.
- Kano Y., Little J.B. Site specific chromosomal rearrangements induced in human diploid cells by X irradiation. *Cytogenet. Cell Genet.* 41, 22-29, **1986**.
- Knehr S., Zitzelsberger H., Braselmann H., Bauchinger M. Analysis for DNA-proportional distributions of radiation-induced chromosome aberrations in various triple combinations of human chromosomes using fluorescence in situ hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 683-690, **1994**.
- Knehr S., Zitzelsberger H., Braselmann H., Nahrstedt U., Bauchinger M. Chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization: Further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.* 70, 385-392, **1996**.
- Knehr S., Zitzelsberger H., Bauchinger M. FISH-based analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using different nomenclature systems. *Int. J. Radiat. Biol.* 73, 135-141, **1998**.
- Knehr S., Huber R., Braselmann H., Schraube H., Bauchinger, M. Multi-colour FISH-painting for the analysis of chromosomal aberrations induced by 220 kV X-rays and fission neutrons. *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 407-418, **1999**.

- Knehr S., Bauchinger M. Application of FISH painting for dose reconstruction: current status and views of the GSF cytogenetics group. *Radiat. Prot. Dosim.* 88, 15-20, **2000**.
- Kodama Y., Nakano M., Ohtaki K., Dongcham R., Awa A.A., Nakamura N., Estimation of minimal size of translocated chromosome segments detectable by fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 35-39, **1997**.
- Kovacs M.S., Evans J.W., Johnstone I.M., Brown J.M. Radiation-induced damage, repair and exchange formation in different chromosomes of human fibroblasts determined by fluorescence *in situ* hybridization. *Radiat. Res.* 137, 34-43, **1994**.
- Kreth G., Mönkel Ch., Langowski J., Cremer T., Cremer C. Chromatine structure and chromosome aberrations: modeling of damage induced by isotropic and localized irradiation. *Mutat. Res.* 404, 77-88, **1998**.
- Lea D.C., Catcheside D.G. Induction by radiation chromosome aberrations in *Tradescantia*. *J. Genet.* 44, 216, **1942**.
- Lee C.L.Y., Kamra O. The pattern of radiation induced transmissible aberrations in human culture. *Human Gen.* 57, 380-384, **1981**.
- Lindholm C., Tekkel M., Veidebaum T., Ilus T., Salomaa S. Persistence of translocations after accidental exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 74, 565-571, **1998a**.
- Lindholm C., Luomahaara S., Korvistoinen A., Ilus T., Edwards A.A., Salomaa S. Comparison of dose-response curves for chromosomal aberrations established by chromosome painting and conventional analysis. *Int. J. Radiat. Biol.* 74, 27-34, **1998b**.
- Lindholm, I. Mäkeläinen, W. Paile, A. Korvistoinen and S. Salomaa. Domestic radon exposure and the frequency of stable and unstable chromosomal aberrations in lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 921-928, **1999**.
- Littlefield G., McFee A.F., Salomaa S.I., Tucker J.D., Inskip P.D., Sayer A.M., Lindholm C., Mäkinen S., Mustonen R., Sorensen K., Tekkel M., Veidebaum T., Auvinen A., Boice Jr, J.D. Do recorded doses overestimate true doses received by Chernobyl clean-up workers?. Results of cytogenetic analyses of Estonian workers by fluorescence *in situ* hybridization. *Radiat. Res.* 150, 237-249, **1998**.
- Littlefield G., McFee A.F., Sayert A.M., O'Neill J.P., Kleinerman R.A., Mahor M.H. 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. Protect. Dosim.* 88, 59-68, **2000**.
- Lloyd D.C., Purrot R.J., Reeder E.J. The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people. *Mutat. Res.* 72, 523-532, **1980**.
- Lloyd D. C., Moquet J.E., Oram S., Edwards A.A., Lucas J.N. Accidental intake of tritiated water: a cytogenetic follow-up case on translocation stability and dose reconstruction. *Int. J. Radiat. Biol.* 73, 543-547, **1998**.

- Lucas J.N., Tenjin T., Straume T., Pinkel D., Moore II D., Litt M., Gray J.W. Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence in situ hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.* **56**, 35-44; *Erratum* **56**, 201, **1989**.
- Lucas J.N., Poggensee M., Straume T. The persistence of chromosome translocations in a radiation worker accidentally exposed to tritium. *Cytogenet. Cell Genet.* **60**, 255-256, **1992a**.
- Lucas J.N., Awa A., Straume T., Poggensee M., Kodama Y., Nakano M., Ohtaki K., Weier H.-U., Pinkel D., Gray J., Littlefield G. Rapid translocation frequency analysis in man decades after exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **62**, 53-63, **1992b**.
- Lucas J.N., Chen A.M., Sachs R.K. Theoretical predictions on the equality of radiation-produced dicentrics and translocations detected by chromosome painting. *Int. J. Radiat. Biol.* **69**, 145-153, **1996**.
- Lucas J.N., Deng W., Moore D., Hill F., Wade M., Lewis A., Sailes S., Kramer C., Hsieh A., Galvan N. Background ionizing radiation plays a minor role in the production of chromosome translocations in a control population. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 819-827, **1999**.
- Matsumoto K., Ramsey M.J., Nelson D.O., Tucker J.D. Persistence of radiation-induced translocations in human peripheral blood determined by chromosome painting. *Radiat. Res.* **149**, 602-613, **1998**.
- Matsuoka A., Tucker J.D., Hayashi M., Yamazaki N., Sofuni T. Chromosome painting analysis of X-ray-induced aberrations in human lymphocytes in vitro. *Mutagenesis* **9**, 151-155, **1994**.
- Moore II D.H., Tucker J.D., Biological dosimetry of Chernobyl clean-up workers: Inclusion of age and smoking data provided improved radiation dose estimates. *Radiat. Res.* **152**, 655-664, **2000**.
- Moquet J.A., Edwards A.A., Lloyd D.C., Hone P., The use of FISH chromosome painting for assesment of old doses of ionising radiation. *Radiat. Prot. Dos.* **88**, 27-34, **2000**.
- Morton N.E. Parameters of the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 7474-7476, **1991**.
- Münkel Ch., Eils R., Imhoff J., Dietzel S., Cremer C., Cremer T. Simulation of the distribution of chromosome territories in cell nuclei under topological constrains. *Bioimaging* **3**, 108-120, **1995**.
- Nakano M., Nakashima E., Pawel D.J., Kodama Y., Awa A. Frequency of reciprocal translocations and dicentrics induced in human blood lymphocytes by X-irradiation as determined by fluorescence in situ hibridization. *Int. J. Radiat. Biol.* **64**, 565-569, **1993**.
- Natarajan A.T., Vyas R.C., Darroudi F., Vermeulen S. Frequencies of X-ray-induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by in situ hybridization using chromosome-specific DNA libraries. *Int. J. Radiat. Biol.* **61**, 199-203, **1992**.
- Natarajan,A.T., Darroudi F., Jha A.N. Meijers M., Zdzienicka M.Z. Ionizing radiation induced DNA lesions which lead to chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* **299**, 297-303, **1993**.

- Natarajan A.T., Balajee A.S., Boei, J.J.W.A., Darroudi F., Dominguez I., Hande M.P., Meijers M., Slijepcevic, P., Vermeulen S., Xiao Y. Mechanisms of induction of chromosomal aberrations and their detection by fluorescence *in situ* hybridization. *Mutat. Res.* 372, 247-258, **1996**.
- Neary G.J. Chromosome aberrations and the theory of RBE. I General considerations. *Int. J. Radiat. Biol.* 9, 477, **1965**.
- Obe G., Voght H.J., Madle S., Fähring A., Heller W.D. Double-blind study on the effect of cigarette smoking on the chromosome of human peripheral blood lymphocytes *in vivo*. *Mutat. Res.* 92, 309-319, **1982**.
- Obe G., Johannes C., Schulte-Frohlinde D. DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleasas as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis.* 7, 3-12- **1992**.
- Pandita T.K., Gregoire V., Dhingra K. Hittelman W.N. Effect of chromosome size on aberration levels caused by gamma radiation as detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell. Genet.* 67, 94-101, **1994**.
- Papworth D. Appendix in: Radiation-induced chromosomal aberrations in the plant *Tradescantia*, by J.R.K. Savage. *Radiat. Bot.* 15, 87-140, **1975**.
- Perry P., Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251, 156-157, **1974**.
- Pinkel D., Straume T., Gray J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 2934-2938, **1986**.
- Pressl S., Edwards A., Stephan G. The influence of age, sex and smoking habits on the background level of FISH-detected translocations. *Mutat. Res.* 442, 89-95, **1999**.
- Puerto S., Surrallés J., Ramirez M.J., Creus A., Marcos R. Equal induction and persistence of chromosome aberrations involving chromosomes with heterogeneous lengths and gene densities. *Cytogenet. Cell Genet.* 87, 62-68, **1999**.
- Ramsey M.J., Moore D.H., Briner J.F., Lee D.A., Olsen L.A., Senft J.R., Tucker J.D. The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting. *Mutat. Res.* 338, 95-106, **1995**.
- Rao, C.R. Chakravarti, I.M., Some small sample tests of significance for a Poisson distribution. *Biometrics.* 12, 264-282, **1956**.
- Revell S.H. A new hypothesis for "chromatid" changes, in: Z.M. Bacq, P. Alexander (Eds), *Proc. Radiobiology Symposium, Liège, Butterworth, London, 243-253, 1955*.
- Sachs R.K., Awa A., Kodama Y., Nakano M., Ohtaki K., Lucas J.N. Ratios of radiation-produced chromosome aberrations as indicators of large-scale DNA-geometry during interphase. *Radiat. Res.* 133, 345-350, **1993**.
- Sachs R.K., Van den Engh G., Trask B.J., Yokota H., Hearst J.E. A random-walk/giant loop model for interphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 2710-2714, **1995**.

- Sachs R.K., Rogoff A. , Chen S.M., Simpson P.J., Sachs R.K., Hahnfeldt P., Hlatky L.R., Underprediction of visibly complex chromosome aberrations by a recombinatorial-repair ('one-hit') model. *Int. J. Radiat. Biol.* 76, 129- 148, **2000**.
- Salassidis K., Georgiadou-Schumacker V., Braselmann H., Müller P., Peter R. U., Bauchinger M. 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**.
- Salassidis k, Braselmann H., Okladnikova N.D., Pressl S., Stephan G., Snigiryova G., Bauchinger M. Analysis of symmetrical translocations for retrospective biodosimetry in radiation workers of the Mayak nuclear-industrial complex (Southern Urals) using FISH-chromosome painting. *Int. J. Radiat. Biol.* 74, 431-439, **1998**.
- Salomaa S., Sevan'kaev A.V., Zhloba A.A., Kumpusalo E., Makinen S., Lindholm C., Kumpusalo L., Kolmakow S., Nissinen A. Unstable and stable chromosomal aberrations in lymphocytes of people exposed to Chernobyl fallout in Bryansk, Russia. *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 51-59, **1997**.
- Savage, J.R.K. Sites of radiation induced chromosome exchanges. *Current Topics in Radiation Research*, 6, 129-194, **1970**.
- Savage, J.R.K. Assignment of aberration breakpoints in banded chromosome. *Nature* 270, 513-514, **1977**.
- Savage J.R.K. Interchange and intra-nuclear architecture. *Environ. Mol. Mut.* 22, 234-244, **1993**.
- Savage J.R.K., Simpson P.J. On the scoring of FISH-"painted" chromosome exchange aberrations. *Mutat. Res.* 307, 345-353, **1994a**.
- Savage J.R.K., Simpson P.J. FISH "painting" patterns resulting from complex exchanges. *Mutat. Res.* 312, 51-60, **1994b**.
- Savage J.R.K. Insight into sites. *Mutat. Res.* 366, 81-95, **1996**.
- Savage J.R.K., Tucker J.D. Nomenclature systems for FISH-painted chromosome aberrations. *Mutat. Res.* 366, 153-161, **1996**.
- Sax K. Chromosome aberrations induced by X-rays. *Genetecis* 23, 494-516, **1938**.
- Schmid E., Zitzelsberger H., Braselmann H., Gray J.W., Bauchinger M. Radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hibridization with a triple combination of composite whole chromosome-specific DNA probes. *Int. J. Radiat. Biol.* 62, 673-678, **1992**.
- Schmid E., Braselmann H., Nahrstedt U. Comparison of -ray induced dicentric yields in human lymphocytes measured by conventional analysis and FISH. *Mutat. Res.* 348, 125-130, **1995**.
- Sevan'kaev A.V., LLOYD D.C., Edwards A.A., Mikhailova G.F., Nugis V.Yu., Domracheva E.V., Baranov A.E., Davtian A.A., Gordeeva A.A., Gusev I.A., Guskova A.K., Moiseenko V.V.

- Olshanskaya Yu.U. Protracted overexposure to a ¹³⁷Cs source: I. Dose reconstruction. *Radiat. Protect. Dosim.* 81, 85-90, **1999**.
- Simpson P.J., Savage J.R.K. Dose-response curves for simple and complex chromosome aberrations induced by X-rays and detected using fluorescence in situ hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.* 69, 429-436, **1996**.
- Simpson P. J., Papworth D.G., Savage J.R.K. X-rays-induced simple, pseudosimple and complex exchanges involving two distinctly painted chromosomes. *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 11-18, **1999**.
- Snigiryova G., Braselmann H., Salassidis K., Shevchenkos V., Bauchinger M. Retrospective biodosimetry of Chernobyl clean-up workers using chromosome painting and conventional chromosome analysis. *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 119-127, **1997**.
- Sorokine-Durm Y., Durand V., Le Roy A., Paillole M., Roy L., Voisin P. Is FISH painting an appropriate biological marker for dose estimates of suspected accidental radiation overexposure? A review of cases investigated in France from 1995 to 1996. *Environ. Health Perspect.* 105, Suppl. 6. **1997**.
- Sorokine-Durm Y., Whitehouse C., Edwards A.. The variability of translocation yields amongst control populations. *Radiat. Prot. Dos.* 88, 93-99, **2000**.
- Spruill M.D., Ramsey M.J., Swiger R.R., Nath J. Tucker J.D. The persistence of aberrations in mice induced by gamma-radiation as measured by chromosome painting. *Mutat. Res.* 356, 135-145, **1996**.
- Stephan G., Pressl S. Chromosome aberrations in human lymphocytes analysed by fluorescence in situ hybridization after in vitro irradiation, and in radiation workers, 11 years after an accidental radiation exposure. *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 293-299, **1997**.
- Stephan G., Pressl S., Koshpessova G, Gusev B.I. Analysis of FISH-painted chromosomes in individuals living near the Semipalatinsk nuclear test site. *Radiat. Res.* 155, 796-800, **2001**.
- Straume T., Langlois R.G., Lucas J.N, Jensen R.H., Bigbee W.L., Ramalho ,A.T. Brandao-Mello C.E.. Novel biodosimetry methods applied to victims of the Goiania accident. *Health Phys.* 60, 71-76, **1991**.
- Straume T., Lucas J.N., Tucker J.D., Bigbee W.R., Langlois R.D. Biodosimetry for a radiation worker using multiple assays, *Health Phys.* 16, 122-130, **1992**.
- Surrallés J., Sebastian S., Natarajan A.T. Chromosome with high gene density are preferentially repaired in human cells. *Mutagenesis* 12, 437-442, **1997**.
- Surrallés J., Puerto S., Ramírez M.J., Creus A., Marcos R., Mullenders L.H.F.,Natarajan A.T. Links between chromatin structure, DNA repair and chromosome fragility. *Mutat. Res.* 404 ,39-44, **1998**.
- Tanaka K., Kamada N., Ohkita T., Kuramoto A., Non random distribution of chromosome breaks in lymphocytes of atomic bomb survivors. *J. Radiat. Res.* 24, 291 304, **1983**.

- Tawn E.J., Cartmell C.L. The effect of smoking on the frequency of asymmetrical and symmetrical chromosome exchanges in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 224, 151-156, **1989**.
- Tawn E.J., Caroline A., Whitehouse A. Frequencies of chromosomal aberrations in a control population determined by G banding. *Mutat. Res.* 490, 171-177, **2001**.
- Tucker J.D., Ramsey M.J., Lee D.A., Minkler J.L. Validation of chromosome painting as a dosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.* 64, 27-37, **1993**.
- Tucker J.D., Lee D.A., Ramsey M.J., Briner J., Olsen L., Moore II D.H. On the frequency of chromosome exchanges in a control population measured by chromosome painting. *Mutat. Res.* 313, 193-202, **1994a**.
- Tucker J.D., Senft J.R. Analysis of naturally occurring and radiation-induced breakpoint locations in human chromosomes 1, 2 and 4. *Radiat. Res.* 140, 31-36, **1994b**.
- Tucker J.D., Morgan W.F., Awa A.A., Bauchinger M., Blakey D., Cornforth M.N., Littlefield L.G., Natarajan A.T., Shassere C. A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenet. Cell. Genet.* 66, 211-221, **1995a**.
- Tucker J.D., Lee D.A., Moore II D.H. 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. **1995b**.
- Tucker J.D., Tawn E.J., Holdsworth D., Morris S., Langlois R., Ramsey M.J., Kato P., Boice Jr, J.D., Tarone R.E., Jensen R.H. Biological dosimetry of radiation workers at the Sellafield Nuclear Facility. *Radiat. Res.* 148, 216-226, **1997**.
- Van Diemen P.C.M., Maasdam D., Vermeulen S., Darroudi F., Natarajan A.T. Influence of smoking habits on the frequencies of structural and numerical chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes using the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique. *Mutagenesis.* 10, 487-495, **1995**.
- Vogel F., Schroeder T.M., The internal order of the interphase nucleus. *Hum. Genet.* 25, 265-297, **1974**.
- Wu H., George K., Yang T.C. Estimate of true incomplete exchanges using Fluorescence *in situ* hybridization with telomere probes. *Int. J. Radiat. Biol.* 73, 521-527, **1998**.
- Wu H., Durante M., Lucas J.N. Relationship between radiation-induced aberrations in individual chromosomes and their DNA content: effects of interaction distance. *Int. J. Radiat. Biol.* 77, 781-786, **2001**.
- Xiao Y., Darroudi F., Grigorova M., Natarajan A.T. Induction and persistence of chromosomal exchanges in mouse bone marrow cells following whole body exposure to X rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 602-613, **1999**.