

***PROPUESTA PARA PREMIO NACIONAL DE LA ACADEMIA DE  
CIENCIAS DE CUBA***

**DOSIMETRÍA CITOGÉNICA PARA ALTAS DOSIS DE  
RADIACION MEDIANTE CONDENSACION PREMATURA DE  
CROMOSOMAS.**

**Ana Ilsa Lamadrid, Ivonne Romero Aguilera,  
Jorge Ernesto González Mesa, Omar García Lima.**

**Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones**

**2013**

## Presentación:

**Título:** Dosimetría citogenética para altas dosis de radiación mediante Condensación Prematura de Cromosomas.

**Unidad ejecutora principal del resultado:** CPHR

**Autores:**

**Autor Principal:** Ana Ilsa Lamadrid Boada. Filiación: CPHR

**Otros Autores:** Ivonne Romero Aguilera, Filiación: CPHR; Jorge Ernesto González Mesa, Filiación: CPHR; Omar García Lima, Filiación: CPHR.

### **Resumen:**

***Antecedentes:*** La dosimetría citogenética es la principal herramienta biológica que se utiliza para realizar estimaciones de dosis en las personas expuestas a las radiaciones ionizantes en los accidentes radiológicos y nucleares. Se fundamenta en las curvas de calibración que se establecen *in vitro* entre las aberraciones cromosómicas en los linfocitos humanos y la dosis de radiación, lo que permite, al ocurrir un accidente tomar sangre de la persona irradiada, cuantificar las aberraciones al microscopio y con los cálculos matemáticos pertinentes establecer la dosis de radiación recibida por el accidentado.

Por la importancia de esta actividad para los planes de respuesta a emergencias que deben existir en cada país el Organismo Internacional de Energía Atómica ha actualizado en el 2011 su manual sobre dosimetría citogenética [1] para la elaboración del cual se solicitó la participación de unos veinte expertos internacionales, entre ellos un cubano.

En su variante tradicional la dosimetría citogenética analiza la frecuencia de cromosomas dicéntricos en metafases en el intervalo de hasta 5-8 Gy de radiación gamma. Para dosis superiores no había posibilidades técnicas de estimación de dosis, hasta el surgimiento a finales del siglo pasado de la técnica de condensación prematura de los cromosomas en su variante química, conocida como PCC por sus siglas en inglés [2]. Esta técnica probó su utilidad en la estimación de altas dosis en el accidente de criticidad de Tokaimura, Japón en 1999 [3] aunque tenía como problema que no había curvas de calibración disponibles en ese momento en ningún laboratorio del mundo. Por lo que nos planteamos como ***objetivos de trabajo:*** Obtener curvas de calibración para radiación gamma y neutrones con la técnica de PCC inducida químicamente, y demostrar experimentalmente que es posible a altas dosis cuantificar anillos y por lo tanto estimar dosis con la técnica de PCC inducida por fusión.

***Resultados:*** Cuba, ha realizado un conjunto de aportes significativos al desarrollo de la dosimetría citogenética para altas dosis que se sustentan en la técnica de PCC que son en síntesis los siguientes:

- 1) La obtención de la primera curva de calibración aparecida en la literatura internacional que establece la relación entre la dosis de radiación gamma y la frecuencia de anillos obtenidos por la técnica de PCC químico (PCC-Rch, por sus siglas en inglés) (Anexo 1).
- 2) Establecimiento de la primera y hasta el momento única curva de calibración publicada en la literatura internacional que establece la relación entre la dosis de neutrones y la frecuencia de PCC-Rch. (Anexo 2).
- 3) La obtención por primera vez de parámetros de referencia que permiten con la técnica de PCC-Rch la estimación de dosis y la fracción del cuerpo irradiada en personas expuestas parcialmente a altas dosis de irradiación gamma (Anexo 3).
- 4) El desarrollo de una escala para la clasificación rápida de personas expuestas a altas dosis de irradiación con neutrones utilizando el “índice PCC” (Anexo 2).
- 5) La demostración experimental de que es posible a altas dosis cuantificar anillos y por lo tanto estimar dosis con la técnica de PCC fusión, que es anterior a la PCC química y elimina la necesidad de cultivar los linfocitos, lo cual ofrece el método citogenético más expedito para la estimación de altas dosis en accidentes publicado hasta el momento (Anexo 4).

El resultado tiene asociadas cuatro publicaciones internacionales (Anexos 1, 2, 3 y 4) y una publicación nacional (Anexo 5). Los dictámenes del consejo científicos se muestran en el anexo 6. En el Anexo 7 se muestra la relación de los artículos donde han sido citados los trabajos de los primeros años (hasta el 2011) y la contribución de los autores a la generalización del resultado. Parte de este trabajo fue premiado como resultado de Organismo en la Agencia de Energía Nuclear y Tecnologías de Avanzada en el año 2011 (Anexo 8). Para la realización de este resultado se han ejecutado dos proyectos nacionales y cinco proyectos internacionales (Anexo 9). Los eventos en que se han presentado trabajos que forman parte del resultado se relacionan en el Anexo 10.

**Conclusiones:** Los resultados obtenidos incrementan la capacidad de respuesta del país para responder a emergencias radiológicas nacionales o regionales.

## **2. Aporte científico personal de cada autor**

### **Autor principal:**

Ana Ilsa Lamadrid Boada: Es la primera autora de 4 de los artículos que soportan el resultado. Trabajó en el diseño y la concepción del trabajo y ejecuto la mayoría de trabajo experimental realizado. Ejecutó tareas técnicas dentro de los proyectos asociados al resultado. Participó en la escritura del resultado, de los artículos científicos publicados y salidas de proyectos. Hizo las presentaciones de los resultados obtenidos en eventos científicos. Filiación: CPHR. % de participación: 40

### **Otros Autores:**

Ivonne Romero Aguilera: Es la primera autora de uno de los artículos que soportan este resultado. Participó en el diseño y la concepción del trabajo. Realizó tareas técnicas asociadas al resultado. Participó en la escritura del resultado y de un artículo científico publicado así como también la escritura de los informes y salidas de proyectos. Hizo presentaciones de resultados en eventos científicos. Filiación: CPHR. % de participación: 20

Jorge Ernesto González Mesa: Realizó tareas técnicas asociadas al resultado. Participó en la escritura del resultado y de los artículos científicos publicados. Filiación: CPHR. % de participación: 20

Omar García Lima: Propuso la realización del trabajo y dirigió los principales proyectos que dieron origen al resultado. Participó en el diseño y la concepción del trabajo. Realizó las coordinaciones iniciales con las diferentes contrapartes extranjeras donde se realizaría parte del trabajo experimental. Participó en la escritura de este resultado y de los artículos que lo acompañan. Actuó como experto en la nueva versión del manual del OIEA sobre dosimetría citogenética. Filiación: CPHR. % de participación: 20

### **Autor para la correspondencia:**

Ana Ilsa Lamadrid Boada

Carretera de la Cantera Victoria II, Km 2½, Pedro Pi, Guanabacoa.

Fax: 682-0573

Email: [ana@cphr.edu.cu](mailto:ana@cphr.edu.cu)

### **3. Resumen del resultado:**

## **“DOSIMETRÍA CITOGÉNÉTICA PARA ALTAS DOSIS DE RADIACION MEDIANTE CONDENSACION PREMATURA DE CROMOSOMAS “.**

### **Antecedentes.**

El momento en que ocurrirá un accidente radiológico y su magnitud son impredecibles. Puede ser desde un incidente con una fuente radioactiva aislada, hasta un accidente masivo o un ataque terrorista con componentes radioactivos. A partir de ese momento se levanta la emergencia radiológica y cuando esto ocurre, es importante estimar las dosis absorbidas por las víctimas y mejor aún conocer su distribución en el cuerpo para planear apropiadamente el tratamiento médico [1]. En la mayoría de los accidentes, la dosimetría física de la dosis absorbida no es posible y aún en casos donde si lo sea, es importante su confirmación por métodos biológicos.

Para realizar una estimación de dosis eficaz en dosimetría biológica, hay dos aspectos que no deben relegarse: disponer de curvas para un amplio rango de dosis y acelerar el tiempo de respuesta lo más posible. La velocidad con que se obtenga la estimación de la dosis puede decidir la garantía de supervivencia de las personas involucradas. Los resultados obtenidos con la dosimetría citogenética se emplean dentro de la variante multiparamétrica junto a otros indicadores biológicos, en la toma de decisiones sobre el tratamiento médico necesario en cada individuo.

Un nuevo método surgió en los años 90, la condensación prematura de los cromosomas (PCC) por inducción química [2], que evita el problema de la pobre proliferación celular presente en el ensayo del dicéntrico que es el “ensayo de oro” de la dosimetría citogenética por su exactitud y precisión pero que no permite estimar dosis por encima de 5-8 Gy. Con el PCC es posible estimar dosis de hasta 20 Gy de radiación gamma como se demostró en este trabajo. La condensación prematura puede hacerse también mediante fusión con células en metafase, denominándose el método PCC fusión [4].

### **El problema a resolver y los objetivos del trabajo**

El PCC químico incrementó sus ventajas cuando se combinó con el recuento de los cromosomas en anillo en lugar de dicéntricos, denominándose PCC ring (PCC-Rch) por su nombre en inglés, convirtiéndose en el instrumento ideal para la estimación de dosis que superen los 5-8 Gy. Cuando surgió esta técnica tenía como **problema** que no estaban elaboradas las curvas de calibración para su aplicación práctica y no se había evaluado su aplicabilidad en irradiaciones parciales. Por lo que se plantearon los siguientes **objetivos de trabajo**.

- **Obtener curvas de calibración para radiación gamma y neutrónica con la técnica de PCC-Rch.**
- **Establecer los parámetros de referencia que permiten con la técnica de PCC-Rch la estimación de dosis y la fracción del cuerpo irradiada en personas expuestas parcialmente a altas dosis de irradiación gamma.**
- **El desarrollo de una escala para la clasificación rápida de personas expuestas a altas dosis de irradiación con neutrones utilizando el “índice PCC”.**

- **Demostrar experimentalmente que es posible a altas dosis cuantificar anillos y por lo tanto estimar dosis con la técnica de PCC fusión.**

## **Resultados**

### **1) La obtención de la primera curva de calibración aparecida en la literatura internacional que establece la relación entre la dosis de radiación gamma y la frecuencia de anillos obtenidos por la técnica de PCC-Rch.**

Esta curva se realizó en el año 2005 en el Laboratorio de Dosimetría Biológica del IRSN por especialistas del CPHR y de la propia institución francesa. Fue esta la primera de las curvas elaboradas por nuestro equipo de trabajo debido a la prevalencia general de sobreexposiciones accidentales con fuentes de Co60, Cs137 o Rayos X. La metodología empleada aparece en el Anexo 1. Para construir esta curva se analizaron 5111 células PCC en estadios G1, G2 y M en el intervalo de dosis de 5 a 25 Gy de radiación gamma 60Co.

Las frecuencias (Y) de anillos observados mostraron una relación lineal con la dosis (D) representada por la ecuación  $Y = c + D$ , cuyos coeficientes fueron:  $D = 0,021 \pm 0,0007$  y  $c = 0,0005 \pm 0,0005$ . El mejor ajuste lineal obtenido concuerda con los modelos planteados para la formación de aberraciones cromosómicas para altas dosis y la frecuencia de anillos encontrada concuerda con la reportada por otros autores utilizando el mismo protocolo de cultivo pero inferior a la obtenida por otros autores, probablemente debido a diferencias en los criterios de conteo.

### **2) Establecimiento de la primera y hasta el momento única curva de calibración publicadas en la literatura internacional que establece la relación entre la dosis de neutrones y la frecuencia de PCC-Rch.**

La obtención por primera vez empleando el método de PCC-R inducido químicamente de una curva dosis efecto para la estimación de exposición *in vitro* a la irradiación con neutrones se realizó en dos grupos de experimentos llevados a cabo por el mismo equipo de trabajo y con las mismas condiciones experimentales. La metodología detallada aparece en el Anexo 2. Para esta curva se analizaron 11 019 células PCC en estadios G1, G2 y M en el intervalo de dosis de 1-25 Gy de irradiación con neutrones de fisión.

El ajuste de las frecuencias de anillos observadas desde 0 a 3,8 Gy fue obtenido con el modelo lineal  $Y = D$ , como era de esperarse para radiaciones de alta transmisión lineal de energía (LET), con un coeficiente  $D = 0,059 \pm 0,003$ . La curva puede utilizarse para casos de sobreexposiciones accidentales a neutrones, pudiendo obtenerse estimaciones precisas hasta 4 Gy, aproximadamente. El empleo de un amplio intervalo de dosis de radiación y la posibilidad de obtener células analizables en este intervalo permitió una caracterización más precisa de la respuesta a la dosis y el proceso de saturación.

### **3) La obtención por primera vez de parámetros de referencia que permiten con la técnica de PCC-Rch la estimación de dosis y la fracción del cuerpo irradiada en personas expuestas parcialmente a altas dosis de irradiación gamma.**

El objetivo de este trabajo fue probar la capacidad potencial de utilizar el ensayo PCC-Rch para la estimación de exposiciones parciales utilizando el enfoque desarrollado por Dolphin [5] para el ensayo del dicéntrico ya que

anteriormente otros autores no habían obtenido buenos resultados al aplicar este ensayo en irradiaciones parciales simuladas [6]. Considerando que el PCC-Rch es aplicable a las altas dosis, realizamos irradiaciones en el intervalo entre 5 y 20 Gy y simulamos exposiciones parciales entre el 10 y el 90%.

Se propuso un valor calculado de  $D_0 = 10.9$  Gy para utilizarlo en el ensayo PCC-Rch, probamos que con este ensayo es posible la diferenciación entre irradiaciones totales y parciales, la estimación de la dosis en la parte del cuerpo irradiada y la estimación de la fracción de sangre inicialmente irradiada. Los resultados obtenidos en las estimaciones probaron la factibilidad de aplicar el ensayo para la estimación de exposiciones parciales. Todos los detalles de este trabajo aparecen en el Anexo 3.

#### **4) El desarrollo de una escala para la clasificación rápida de personas expuestas a altas dosis de irradiación con neutrones utilizando el “índice PCC”.**

El “índice PCC” permitió discriminar con facilidad 3 grupos de dosis: de 0–1 Gy; de 1–10 Gy; y  $> 10$  Gy, lo cual resulta de utilidad en las estimaciones de dosis para exposiciones con neutrones a dosis extremadamente altas donde las estimaciones se encuentran limitadas por el proceso de saturación observado en la formación de anillos. El índice PCC muestra correlación con la dosis de radiación y decrece con la dosis. Un valor del índice PCC menor que 1 indicó que la dosis de radiación estuvo por encima de 10 Gy. Por estos resultados se propone el “índice PCC” como un biomarcador para la clasificación rápida de personas expuestas a altas dosis de irradiación con neutrones. Los coeficientes de las curvas se dan en la publicación que se adjunta en el Anexo 2.

#### **5) La demostración experimental de que es posible a altas dosis cuantificar anillos y por lo tanto estimar dosis con la técnica de PCC fusión, que es anterior a la PCC química, elimina la necesidad de cultivar los linfocitos, lo cual ofrece el método citogenético más expedito publicado hasta el momento para la estimación de altas dosis en accidentes.**

Nos propusimos extender las experiencias y buenos resultados del conteo de anillos en el PCC-Rch para las altas dosis a la técnica del PCC fusión (PCC-Rf) por su inmediatez, con el fin de poner a disposición de la emergencia un método que permitiera obtener estimaciones de altas dosis de radiación en el menor tiempo. Se realizó la fusión de células y la inducción de PCCs utilizando polietilenglicol. Los detalles técnicos se ofrecen en la publicación que se adjunta en el Anexo 4.

El protocolo de fusión utilizado probó su efectividad a dosis tan altas como 20 Gy, permitiendo el análisis de cromosomas en anillos y excesos de fragmentos. Las irradiaciones, la fusión y la preparación de los extendidos se realizaron en el laboratorio de citogenética del Instituto Demókritos de Atenas. Las evaluaciones de las muestras preparadas se hicieron en ambos laboratorios, el griego y el cubano. La relación dosis efecto obtenida entre la frecuencia de anillos y la dosis fue lineal:  $Y = (0.088 \pm 0.005) \times D$ . Se demostró que el ensayo PCC-Rf es apropiado como biodosímetro para la estimación de las altas dosis de radiación y los resultados pueden obtenerse inmediatamente después de la recepción de la muestra en el laboratorio sin necesidad de cultivar los linfocitos. Debemos destacar que independientemente del análisis que pueda realizarse de forma automática, el PCC-Rf puede efectuarse directamente bajo el microscopio y ofrece un rápido, fácil y preciso método para la estimación de la dosis.

### **Originalidad, impacto científico y social, introducción en la práctica y generalización:**

✓ **Cuba es pionera en obtener curvas PCC-R en un amplio rango de dosis de irradiación Gamma y no se conoce que existan curvas para la irradiación con neutrones además de la nuestra.** Las curvas dosis respuesta de los nuevos indicadores incorporados al servicio de dosimetría biológica permiten estimar dosis totales y parciales en un intervalo entre 0,1 Gy y 25 Gy para radiación gamma y entre 1 Gy y 4 Gy para irradiación neutrónica. Además, con el índice PCC es posible clasificar rápidamente **exposiciones a neutrones mayores de 10 Gy**. Esto nos convierte en pioneros en el uso de estos indicadores al reportar por vez primera las ecuaciones matemáticas que correlacionan altas dosis de radiaciones con la frecuencia de PCC-R.

✓ La Dosimetría Biológica en el país puede realizar actualmente la **estimación ágil y precisa de la dosis de radiación absorbida en personas expuestas a altas dosis** de radiación, que antes de la realización de estos estudios no eran alcanzables, lo cual es un elemento primario para seleccionar el tratamiento medico más adecuado para salvar la vida de las personas afectadas.

✓ Esta respuesta profesional y altamente calificada **contribuye directamente al sistema de respuesta a emergencias radiológicas** que ha creado el país en caso de ocurrir contingencias y amplía las posibilidades de contribuir al esclarecimiento de cualquier suceso radiológico anormal que pueda ocurrir en la región, pues Cuba ha comenzado a extender la técnica PCC-Rch a los restantes laboratorios de dosimetría biológica en América Latina.

✓ El desarrollo alcanzado en la Dosimetría Biológica por el Laboratorio de Radiobiología del CPHR se refleja en resultados prácticos que **nos ubican entre los países con capacidad para realizar estimaciones dosimétricas** utilizando un conjunto indicadores citogenéticos en casos de accidentes nucleares o radiológicos.

### **Referencias**

- 1- IAEA (2011) Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. EPR-Biodosimetry. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- 2- Gotoh E, Tanno Y and Takakura K (1995) Simple biodosimetry method for use in cases of high-dose radiation exposure that scores the chromosome number of Giemsa-stained drug-induced prematurely condensed chromosomes (PCC). *Int J Radiat Biol* **81**(1): 33-40.
- 3- Hayata I, Kanda R, Minamihisamatsu M *et al* (2001) Cytogenetical Dose Estimation for 3 Severely Exposed Patients in the JCO Criticality Accident in Tokai-mura. *J Radiat Res*, **42**: Suppl., 149–155.
- 4- Pantelias G E, Maillie H D (1985) Direct analysis of radiation-induced chromosome fragments and rings in unstimulated human peripheral blood lymphocytes by means of the premature chromosome condensation technique. *Mutat. Res.* 149: 67-72.
- 5- Dolphin GW (1969) Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. *Handling of radiation Accident (Proc. Int. Symp. Vienna)* IAEA, Vienna, 215-224.
- 6- Lindholm C, Stricklin D, Jaworska A, *et al* (2010) Premature Chromosome Condensation (PCC) Assay for Dose Assessment in Mass Casualty Accidents. *Radiat Res* **173**(1): 71-78.



#### **4. Descripción científico-técnica detallada del resultado: “DOSIMETRÍA CITOGÉNÉTICA PARA ALTAS DOSIS DE RADIACION MEDIANTE CONDENSACION PREMATURA DE CROMOSOMAS”**

##### **INFORME DETALLADO DEL RESULTADO**

El resultado que presentamos contiene los aportes más significativos al desarrollo de la dosimetría citogenética para altas dosis en Cuba, sustentados en un conjunto de curvas de calibración con técnicas de PCC que resulta imprescindible en un laboratorio de dosimetría biológica para poder estimar dosis en cualquier situación accidental y que relacionamos a continuación:

- 1) La obtención de la primera curva de calibración aparecida en la literatura internacional que establece la relación entre la dosis de radiación gamma y la frecuencia de anillos obtenidos por la técnica de PCC químico (PCC-Rch, por sus siglas en inglés) (Anexo 1).
- 2) Establecimiento de la primera y hasta el momento única curva de calibración publicada en la literatura internacional que establece la relación entre la dosis de neutrones y la frecuencia de PCC-Rch. (Anexo 2).
- 3) La obtención por primera vez de parámetros de referencia que permiten con la técnica de PCC-Rch la estimación de dosis y la fracción del cuerpo irradiada en personas expuestas parcialmente a altas dosis de irradiación gamma (Anexo 3).
- 4) El desarrollo de una escala para la clasificación rápida de personas expuestas a altas dosis de irradiación con neutrones utilizando el “índice PCC” (Anexo 2).
- 5) La demostración experimental de que es posible a altas dosis cuantificar anillos y por lo tanto estimar dosis con la técnica de PCC fusión, que es anterior a la PCC química y elimina la necesidad de cultivar los linfocitos, lo cual ofrece el método citogenético más expedito para la estimación de altas dosis en accidentes publicado hasta el momento (Anexo 4).

Palabras clave: dosimetría biológica; dosimetría citogenética; condensación prematura de cromosomas; PCC-R; irradiación con altas dosis; irradiación parcial; valor Do; Calyculina A

Abreviaturas: PCC (condensación prematura de cromosomas y/o cromosomas prematuramente condensados); PCC-Rch (ensayo de PCC químicamente inducido utilizando el recuento de anillos como biomarcador); PCC-Rf (ensayo de PCC inducido mediante fusión utilizando el recuento de anillos como biomarcador); CHO (Chinese hamster ovary); PEG (polyethylene glycol); Do (dosis a la cual muere el 37% de la población de células irradiadas); SPBI (por las siglas en inglés de irradiación parcial simulada).

## **INTRODUCCIÓN**

La dosimetría biológica consiste en la cuantificación del daño ocasionado por las radiaciones ionizantes sobre las células del propio individuo, la cual se compara con curvas dosis respuesta realizadas *in vitro* y requiere que el parámetro medido perdure el tiempo suficiente para ser observado, que sea reproducible, de alta especificidad respecto a las radiaciones; que alcance un cierto intervalo de dosis; que la muestra sea de fácil recolección y que los resultados se obtengan de manera rápida. Mientras mayor número de esas características posea el indicador medido, será más útil, confiable y preciso. La dosimetría citogenética convencional utiliza el dicéntrico para las estimaciones y es hasta el momento la más precisa y confiable [1], llamado por muchos el “ensayo de oro” de la dosimetría citogenética.

El momento en que ocurrirá un accidente radiológico y su magnitud son impredecibles. Puede ser desde un incidente con una fuente radioactiva aislada, hasta un accidente masivo o un ataque terrorista con componentes radioactivos. A partir de ese momento se levanta la emergencia radiológica y cuando esto ocurre, es importante estimar las dosis absorbidas por las víctimas y mejor aún conocer su distribución en el cuerpo para planear apropiadamente el tratamiento médico [1]. En la mayoría de los accidentes, la dosimetría física de la dosis absorbida no es posible y aún en casos donde si lo sea, es importante su confirmación con la dosimetría biológica, la cual aporta frecuentemente criterios importantes en la investigación del accidente. Si la dosis recibida está por encima de 1 Gy ayuda a tomar decisiones sobre la terapia que necesita el irradiado y da información de los probables efectos determinísticos que sobrevendrán. Si las dosis son menores el médico podrá orientar al afectado sobre los riesgos de los efectos estocásticos a largo plazo, por ejemplo la magnitud del riesgo de desarrollar cáncer y cuando la dosimetría arroje una dosis menor de 50 mGy será muy tranquilizador para la persona conocer que no se ha encontrado un daño cromosómico significativo. El ensayo del dicéntrico muestra su mayor precisión en el intervalo de dosis entre 0,1 y 5 Gy, por encima de este, los dicéntricos saturan.

En la investigación de accidentes radiológicos es importante disponer de una biodosimetría segura para un espectro de exposición lo más amplio posible, por ello se han comenzado a desarrollar nuevos indicadores que vencen algunas de las limitaciones del ensayo de dicéntricos para las altas dosis, uno de ellos surgió en los años 90, la condensación prematura de los cromosomas (PCC) por inducción química [2], que evita el problema de la pobre proliferación celular presente en el ensayo del dicéntrico, incrementando sus ventajas cuando se combina con el recuento de los cromosomas en anillo en lugar de dicéntricos, denominándose PCC ring (PCC-Rch) por su nombre en inglés [3], convirtiéndose en el instrumento ideal para la estimación de dosis que superen los 5-8 Gy pues con ese método es posible estimar hasta 20 Gy pues después de esa dosis los anillos saturan [4]. Sin embargo, con este mismo método es posible hacer estimaciones a dosis aún mayores no cuantificando los anillos sino con el índice

PCC, que evalúa el % de células con cromosomas condensados entre el total de núcleos de linfocitos observados para casos de víctimas expuestas a altos niveles de radiación donde hay que tomar decisiones rápidas para seleccionar el tipo de terapia a emplear, aunque no se publicaron curvas para su aplicación. [5]. Cuando surgió el ensayo tenía como problema que no estaban elaboradas las curvas de calibración para su aplicación práctica y no se había evaluado su aplicabilidad en irradiaciones parciales.

A pesar de las ventajas mencionadas, el ensayo PCC inducido químicamente requiere 2-3 días para el cultivo de linfocitos y el análisis de las aberraciones, y mantiene por consiguiente algunas de las desventajas del ensayo convencional del dicéntrico.

Un acercamiento apropiado para disminuir radicalmente el tiempo de respuesta en situaciones de emergencia parece ser la visualización directa de aberraciones en linfocitos en fase Go mediante la fusión con células CHO (Chinese hamster ovary), eliminando no solo las 48 horas del cultivo necesario en ambos métodos: dicéntrico y PCC químico, sino permitiendo además el análisis de ambos tipos de linfocitos T y B con lo cual se analizan un mayor número de linfocitos como biodosímetros. Al inicio, el método PCC fusión resultó complejo [6], pero posteriormente fue estandarizado y simplificado [7] hasta convertirse en un método rápido y reproducible. Se ha usado en biodosimetría analizando fragmentos en exceso principalmente y solo hasta 6 Gy, pero los fragmentos en exceso como biodosímetros tienen la limitante de que su frecuencia disminuye rápidamente con el tiempo y esto requiere tener diferentes curvas de calibración para los diferentes tiempos post exposición.

Conocer la dosis absorbida y su distribución en el cuerpo de las víctimas en un breve tiempo puede decidir la garantía de supervivencia de las personas lo que puede estimarse mediante la reconstrucción del accidente, las reacciones de la piel y otros indicadores, incluyendo el ensayo de dicéntricos [1] pero los intentos de aplicar la modelación desarrollada para el ensayo de dicéntricos por Dolphin al ensayo PCC-Rch como herramienta en exposiciones parciales simuladas no dieron buenos resultados en las circunstancias ensayadas, probablemente debido a un número insuficiente de células contadas [8].

Resumiendo, para realizar una estimación de dosis eficaz en dosimetría biológica, hay varios aspectos que no deben relegarse, como:

- utilizar ensayos que respondan a un amplio rango de dosis y poseer curvas de calibración de los indicadores que se miden
- utilizar ensayos que aceleren el tiempo de respuesta lo más posible
- poder aplicar en esos ensayos herramientas matemáticas que permitan conocer qué fracción del cuerpo de la víctima ha resultado irradiada

Con esos objetivos hemos trabajado sobre los ensayos citogenéticos más prometedores durante estos últimos 8 años en el Laboratorio de Radiobiología del Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones y hemos logrado desarrollar nuevas curvas de calibración utilizando métodos que permiten hacer

estimaciones totales y parciales en un rango de dosis mayor y en menor tiempo. Aquí presentamos el conjunto de curvas de calibración del cual se necesita disponer en un laboratorio de dosimetría biológica para poder estimar dosis en cualquier situación accidental.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Preparación de las muestras:** Las extracciones de sangre se hicieron con jeringuillas desechables con heparina de litio y dispensada en tubos para su posterior irradiación. Los donantes voluntarios dieron su consentimiento por escrito y fueron informados de los fines de las investigaciones acorde a la Ley No 41 del Ministerio de Salud Pública de Cuba en caso de las irradiaciones hechas en el CPHR. Para las irradiaciones realizadas en el Instituto de Radioprotección y Seguridad Nuclear de Francia, la sangre fue colectada acorde a la Ley de Bioética francesa (L 2004-800).

**Irradiación de las muestras:** En todas las irradiaciones realizadas se siguieron las recomendaciones del Organismo Internacional de Energía Atómica para la producción de las curvas dosis respuesta *in vitro* [1]. La dosimetría se expresó en términos de Kerma en aire.

Curva de calibración para PCC-Rch en cromosomas prematuramente condensados químicamente con irradiación gamma: las irradiaciones se realizaron en las instalaciones ICO-4000 del IRSN, Francia con  $^{60}\text{Co}$  a dosis de 5; 7,5; 10; 20 y 25 Gy a una tasa de dosis de 0,5 Gy/min.

Curva de calibración para PCC-Rch y escala de clasificación con el índice PCC en cromosomas prematuramente condensados químicamente con irradiación con neutrones: los tubos se expusieron a neutrones de fisión en las instalaciones de SILENE (Valduc, Francia) a dosis de 5; 7,5; 10; 20 y 25 Gy, la energía media del espectro de neutrones fue 0,49 MeV.

Metodología para la estimación de irradiaciones parciales con altas dosis mediante el ensayo PCC-Rch: las irradiaciones se realizaron en las instalaciones ICO-4000 del IRSN, Francia con  $^{60}\text{Co}$  a dosis de 1, 5, 7.5, 10, 15 y 20 Gy una tasa de dosis de 0,5 Gy/min.

Curva de calibración de PCC-Rf en cromosomas prematuramente condensados mediante fusión con irradiación gamma: Las irradiaciones se realizaron en un irradiador GammaCell 220 (Atomic Energy of Canada, Ltd., Ottawa) con 5, 10, 15 and 20 Gy, a una tasa de dosis de 0.5 Gy/min.

## **DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO PCC-Rch.**

Después de la irradiación, la sangre se mantuvo a 37 °C durante 2 horas, permitiendo actuar los mecanismos de reparación celular. Los cultivos de linfocitos para las curvas de PCC-R se hicieron con 0.5 ml de sangre total en 5 ml de RPMI 1640 suplementado con L-glutamine, 20% suero fetal de ternero y 1% phytohaemagglutinin (PHA). A las 24 h de comenzado el cultivo se añadió colcemida (0.05 µg/ml),

y 1 hora antes de la cosecha se añadió Calyculina A (50 nM). Al cabo de las 48 horas de cultivo, las células se trataron con solución hipotónica de KCl (0.075M) durante 8 min a 37°C y se fijaron realizando tres cambios de fijador (methanol:acetic acid, 3:1 v/v). Finalmente, se gotearon en las láminas 30 µl de la suspensión celular obtenida. Las láminas secas se tiñeron con una solución de Giemsa al 4%. Se registraron las células PCC en las fases G1, G2, metafase y anafase y los anillos se cuantificaron considerando como un anillo aquel con un orificio visible en su centro, o cuando los anillos eran perfectamente redondos y su tamaño excedía el ancho de las cromátida en esa célula. En las células PCC en fase G2 y en anafase cuando se observaron dos anillos idénticos fue registrado como un anillo considerando que la pareja observada procedía originalmente del mismo cromosoma. Dos operadores participaron en los conteos acorde al criterio de considerar como un anillo aquel con un orificio visible en su centro, o cuando los anillos eran perfectamente redondos y su tamaño excedía el ancho de las cromátida en esa célula. En las células PCC en fase G2 y en anafase cuando se observaron dos anillos idénticos fue registrado como un anillo considerando que la pareja observada procedía originalmente del mismo cromosoma. La frecuencia de anillos PCC se evaluó en células PCC en G1, G2 y M con más de 46 elementos. Se analizaron como mínimo 100 anillos o 500 células PCC por cada dosis. Las frecuencias de PCC-R en todos los estadios del ciclo celular se calcularon como la relación entre los anillos encontrados y el total de células observadas. Se utilizó un microscopio Nikon SA, Japón, con 1000 aumentos. Para el análisis estadístico se usó el test "U" para testar si la dispersión de las aberraciones describía una distribución de Poisson [9]. Las relaciones dosis efecto se ajustaron acorde al modelo lineal, usando el método de la máxima verosimilitud descrito por Papworth [10]. El índice PCC se calculó como el porcentaje de células con cromosomas prematuramente condensados entre todas las células observadas. Las células PCC en fase S no se incluyeron en el cálculo de este.

## **DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGIA PARA LA ESTIMACION DE DOSIS EN IRRADIACIONES PARCIALES.**

Para simular las exposiciones parciales, se mezcló a sangre irradiada a 10, 15 y 20 Gy con sangre no irradiada del mismo donante en proporciones finales de 10, 25, 50, 75, 90 %. Adicionalmente se mezcló sangre irradiada a 1, 5, y 7.5 Gy con sangre no irradiada en proporción final del 50 % solamente. Todos los datos se utilizaron para la estimación de la Do. Se utilizó el ensayo PCC-Rch que fue realizado de la misma forma que se describió anteriormente [4]. Este protocolo fue seleccionado porque demostró que en la irradiaciones con sangre total la formación de anillos seguía una distribución de Poisson.. Se registraron las células PCC en las fases G1, G2, metafase y anafase y los anillos se cuantificaron siguiendo el mismo criterio explicado anteriormente. En las figuras del Anexo 3 se ilustra la morfología de los anillos en los PCCs en diferentes fases del ciclo celular. Se analizaron como norma 500 células

PCC o 100 anillos para cada punto. Para simular un recuento “triage” (estratificación), se tomaron las lecturas de los primeros 300 PCC o 50 anillos. La curva dosis respuesta fue ajustada por el método de verisimilitud máxima en el intervalo de 0-20 Gy utilizando los datos de los 3 donantes independientemente. Las diferencias entre donantes fue comprobada usando el test F para la comparación de las curvas y el test “t de student” para la comparación de las frecuencias. Las distribuciones de anillos PCC por célula se evaluaron usando el programa DoseEstimate. La U normalizada del índice de dispersión ( $2/Y$ ) se analizó para cada dosis y cada proporción de sangre irradiada, asumiendo una distribución de Poisson si  $U \leq 1.96$ , y sobredispersión si  $U > 1.96$ . El porcentaje de identificaciones correctas SPBI (%SPBIID) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%SPBI_{ID} = \frac{\#SPBI_{u>1.96}}{\#SPBI_T} \cdot 100,$$

Donde  $\#SPBI_{u>1.96}$  es el número de distribuciones por célula que no siguió Poisson y  $\#SPBI_T$  es el número total de distribuciones de anillos por célula analizada.

**Cálculo del valor de Do:** La fracción sobreviviente (S) se calculó usando las ecuaciones reportadas por Lloyd y colaboradores [11] y Matsubara y colaboradores [12]. Las frecuencias de anillos por célula necesarias para los cálculos se obtuvieron de las irradiaciones totales y parciales simuladas. La Do se estimó utilizando la regresión lineal entre  $\ln(S)$  y la dosis. La regresión lineal estuvo forzada a pasar por los puntos del 100% de sobrevivencia y la dosis cero. El procedimiento detallado puede verse en material suplementado en el Anexo 3.

**Estimación de la fracción expuesta y su dosis.** La fracción irradiada y su dosis fueron estimadas aplicando el método de Poisson contaminado originalmente propuesto para el ensayo del dicéntrico [1] y utilizando la curva de calibración establecida en este trabajo y las frecuencias de anillos estimadas en la fracción irradiadas para cada donante. El procedimiento detallado puede verse en el material suplementado en el Anexo 3.

Se consideraron aceptables las dosis estimadas dentro del 30% de la dosis real y las fracciones estimadas dentro del 10% del valor real de la fracción irradiada.

## DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO PCC-Rf.

Después de la irradiación de las muestras de linfocitos aislados y de sangre total, se mantuvieron a 37 °C durante 8 y 24 horas después de la fusión con células CHO mitóticas permitiendo actuar los mecanismos de reparación celular. Los cultivos de células CHO (Chinese hamster ovary) se hicieron en medio McCoy's 5A suplementado con 10% de suero fetal, 1% de L-glutamina y antibióticos y se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. Se mantuvieron como cultivos monocapa en

frascos plásticos de 75-cm<sup>2</sup> a una densidad inicial de  $4 \times 10^5$  células por frasco. Se añadió colcemida a una concentración final de 0.1 g/ml a los cultivos CHO cada 4 horas y las células mitóticas acumuladas en ese tiempo fueron colectadas por “desprendimiento selectivo” repitiendo ese proceso varias veces y utilizadas como un suplemento de células mitóticas para inducir los PCC en los linfocitos. Las células CHO mitóticas obtenidas ( $1.5 \times 10^6$ /frasco) fueron fijadas y controladas al microscopio y después guardadas en hielo o congeladas hasta su empleo en la fusión con linfocitos en interfase para la inducción de PCC. El índice mitótico de las células CHO fue mayor del 95% en todos los experimentos realizados. Se realizó la fusión y la inducción de los PCCs utilizando polyethylene glycol (PEG) de la siguiente forma: las células CHO mitóticas y los linfocitos no estimulados (G0-PBLs) se lavaron independientemente con medio McCoy's 5A libre de suero y se mezclaron en una proporción 1:5 en tubos de cultivo de 15 ml de fondo redondo y en presencia de colcemida. Después de centrifugar a  $200 \times g$  durante 5 minutos, el sobrenadante se descartó sin alterar el botón y se añadieron 0.15 ml de polietilenglicol al 50% (p/v) (PEG 1500, Boehringer Mannheim) y se dejó durante 1 min. Posteriormente se añadió 1.5 ml of PBS, el tubo se movió suavemente y la suspensión celular se centrifugó a  $200 \times g$  durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y el botón de células se resuspendió en 0.7 ml de medio McCoy's 5A a 37 °C. La fusión y la inducción de PCCs concluyó a los 50–60 minutos a 37 °C. Las suspensiones de células PCC se trataron con una solución hipotónica de KCl (0,075 M) durante 30 minutos a 37 °C y se fijaron con una mezcla de metanol: ácido acético, 3:1 v/v. Finalmente, las células se extendieron por goteo en láminas portaobjetos. Las láminas secadas al aire se colorearon con una solución de Giemsa al 3%. Tres operadores de ambos laboratorios, griego y cubano, participaron en los recuentos de anillos y fragmentos en exceso, identificando manualmente los linfocitos humanos, los cuales aparecen como un grupo de cromosomas monofilares (muy cerca de los cromosomas CHO mitóticos) los que pueden ser distinguidos fácilmente por su morfología y grado de condensación. Una imagen representativa de un linfocito PCC no irradiado que muestra 46 cromosomas con una sola cromátida puede verse en la figura 1 del artículo del Anexo 4. Los fragmentos en exceso (mas de 46) fueron contados en cada punto experimental en 50 células como mínimo en un monitor acoplado al microscopio con un sistema de análisis de imágenes (Ikaros Metasystems, Alemania). Los anillos también pueden ser identificados fácilmente en el monitor o directamente en el microscopio. Las cromátidas con forma circular cerradas con un orificio visible o sin él se consideraron como anillos PCC-Rf los cuales hemos señalado con flechas cortas en las figuras que aparecen en el artículo del Anexo 4. Para cada punto experimental se contaron al menos 100 anillos, como se sugiere para el ensayo de dicéntricos para obtener un estimado preciso de la dosis. La frecuencia de PCC-Rf se evaluó como la relación entre el número de anillos contados y el número de células analizadas. Las relaciones dosis-efecto se ajustaron al modelo lineal con la ayuda del programa DoseEstimate [13]. La significación de la

pendiente (coeficiente alfa) se comprobó con el test t y la bondad de ajuste con el test de Chi-cuadrado. El ajuste a la distribución de Poisson se realizó mediante el test U. Las diferencias entre las pendientes de las curvas se comprobaron mediante el test F, mientras que las diferencias entre las frecuencias de las aberraciones se hicieron mediante el test t.

**Generalidades para ambos métodos:** En ambos métodos los protocolos ensayados fueron seleccionados cuidadosamente y probados por sus rendimientos evaluando en todos los casos el índice PCC. La cuantificación de cromosomas en anillo, un aspecto discutido en la literatura publicada y que puede conducir a diferencias entre los resultados de diferentes laboratorios se hizo estableciendo criterios propios, tal y como recomienda el Manual del OIEA para la elaboración de las curvas de calibración [1]. Las indicaciones del Manual OIEA fueron observadas en todos los pasos de la elaboración de las curvas como puede constatarse en los Materiales y Métodos de los artículos aquí presentados.

## **RESULTADOS**

Los resultados parciales que presentamos como parte de este resultado describen el conjunto de curvas de calibración necesario en un laboratorio de dosimetría biológica para poder estimar dosis en cualquier situación accidental y son los siguientes:

### **1) La obtención de la primera curva de calibración aparecida en la literatura internacional que establece la relación entre la dosis de radiación gamma y la frecuencia de anillos obtenidos por la técnica de PCC-Rch.**

Esta curva se realizó en el año 2005 en el Laboratorio de Dosimetría Biológica del IRSN por especialistas del CPHR y de la propia institución francesa. Fue esta la primera de las curvas elaboradas por nuestro equipo de trabajo debido a la prevalencia general de sobreexposiciones accidentales con fuentes de Co60, Cs137 o Rayos X. La metodología empleada aparece en el Anexo 1. Para construir esta curva se analizaron 5111 células PCC en estadios G1, G2 y M en el intervalo de dosis de 5 a 25 Gy de radiación gamma 60Co. Las frecuencias (Y) de anillos observados mostraron una relación lineal con la dosis (D) representada por la ecuación  $Y = c + D$ , cuyos coeficientes fueron:  $D = 0,021 \pm 0,0007$  y  $c = 0,0005 \pm 0,0005$ . El mejor ajuste lineal concuerda con los modelos planteados para la formación de aberraciones cromosómicas para irradiaciones de baja transmisión lineal de energía (LET) y la frecuencia de anillos encontrada concuerda con la reportada por otros autores utilizando el mismo protocolo de cultivo pero inferior a la obtenida por otros autores, probablemente debido a diferencias en los criterios de conteo. El ensayo es de utilidad en casos de sobreexposiciones accidentales, donde la dosis recibida por la víctima esté por encima de 5 Gy, pues este ensayo soluciona las principales dificultades que presenta la técnica convencional de dicéntricos a esas dosis que son la saturación de los dicéntricos y el bajo índice mitótico de los cultivos. Más detalles se muestran en el Anexo 1.



## 2) Establecimiento de la primera y hasta el momento única curva de calibración publicadas en la literatura internacional que establece la relación entre la dosis de neutrones y la frecuencia de PCC-Rch.

Las curvas de calibración para los neutrones de fisión y otras radiaciones de alta LET, son escasas en la dosimetría citogenética, y particularmente para el ensayo PCC-Rch no conocemos que hasta el momento se haya publicado ninguna.

La obtención por primera vez empleando el método de PCC-R inducido químicamente de una curva dosis efecto para la estimación de exposición *in vitro* a la irradiación con neutrones se realizó en dos grupos de experimentos llevados a cabo por el mismo equipo de trabajo y con las mismas condiciones experimentales.

En la primera serie de experimentos se analizaron 4564 células. Esta serie incluyó dosis de 5.4; 5.6; 9.4; 12.7 y 26.1 Gy . Al considerar las dosis 5.4 a la 26.1 Gy se observó una recta pero la bondad de ajuste resultó ser insuficiente ( $r^2 = 0.90$ ). Para evaluar la pendiente de la curva a dosis por debajo de 5 Gy se realizó una segunda serie experimental en la región de bajas dosis, considerando que exposiciones a irradiación con neutrones pueden ser de diferentes magnitudes y de 1-5 Gy pueden causar daños comparables a altas dosis de radiación gamma. En la segunda serie experimental, se analizaron 6455 células mostrando una curva lineal en el intervalo desde 0 a 3.8 Gy. En total se evaluó el comportamiento de la frecuencia de anillos PCC en 11 019 células PCC en estadios G1, G2 y M en el intervalo de dosis de 1-26 Gy de irradiación con neutrones de fisión. Cuando comparamos las frecuencias de anillos PCC entre los donantes no encontramos diferencias significativas a ninguna dosis, por lo tanto los donantes fueron unidos para calcular la curva de calibración. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  SD de dos sujetos en la serie experimental 1 y tres sujetos en la serie experimental 2. Las distribuciones de los anillos por célula fueron del tipo Poisson o Neyman, para todas las dosis. El mejor ajuste de las frecuencias de anillos observadas desde 0 a 3,8 Gy fue obtenido con el modelo lineal  $Y = D$ , como era de esperarse para radiaciones de alta transmisión lineal de energía (LET), con un coeficiente  $= 0,059 \pm 0,003$ , ( $t = 19.7$ ,  $p < 0.05$ ) , observándose una saturación de los PCC-R en un valor cercano a los 4 Gy, sin embargo fue posible analizar células expuestas hasta los 26 Gy.

El uso de amplio intervalo desde 1 a 26 Gy y la posibilidad de obtener células analizables en ese intervalo permitió una caracterizaron mas precisa de la respuesta a la dosis y al proceso de saturación. En trabajos previos se habían utilizado intervalos entre 0 y 3 Gy supuestamente por dificultades asociadas con la capacidad de división después de altas dosis y radiaciones de alto LET. Una excepción lo constituye el intervalo de 1-8 Gy reportado por Wang [14], donde no fue posible ajustar la relación dosis efecto por encima de 4 Gy probablemente debido a la saturación de los dicéntricos.

Acorde a nuestros resultados la frecuencia de anillos PCC a 3.8 Gy es de  $0.25 \pm 0.01$  por célula manteniéndose estable hasta dosis de 5.4 Gy, mientras que hay un ligero incremento hasta  $0.33 \pm 0.07$  para el punto de 26 Gy. El valor del coeficiente alfa es un orden menor que los coeficientes alfa para las curvas de neutrones que aparecen en la literatura para dicéntricos lo cual se corresponde con la diferencia de un orden en la formación de anillos y dicéntricos. Si comparamos el coeficiente lineal de nuestras curvas de calibración (gamma vs neutrones), el coeficiente de la curva de neutrones es 2.8 veces el de gamma, lo que es equivalente a la Eficacia Biológica

Relativa (RBE) de 2.8 para irradiación con neutrones. Esto es muy similar a lo descrito para radiaciones de alto LET.

En conclusión la curva de calibración elaborada puede ser utilizada en caso de exposición accidental a irradiación con neutrones y obtener una estimación precisa de la dosis hasta 4 Gy. Mas detalles de este trabajo pueden verse en el Anexo 2.

### **3) La obtención por primera vez de parámetros de referencia que permiten con la técnica de PCC-Rch la estimación de dosis y la fracción del cuerpo irradiada en personas expuestas parcialmente a altas dosis de irradiación gamma.**

La estimación de la dosis y de la fracción del cuerpo irradiada es una información importante en la respuesta médica primaria, en el caso de un accidente radiológico. El ensayo PCC-Rch ha sido desarrollado para la estimación de las altas dosis, sin embargo se le ha dedicado poca atención a su aplicabilidad en las irradiaciones parciales. El objetivo de este trabajo fue probar la capacidad potencial de utilizar el ensayo PCC-Rch para la estimación de exposiciones parciales utilizando el enfoque desarrollado por Dolphin [15] para el ensayo del dicéntrico ya que anteriormente otros autores no habían obtenido buenos resultados al aplicar este ensayo en irradiaciones parciales simuladas. Considerando que el PCC-Rch es aplicable a las altas dosis, realizamos irradiaciones en el intervalo entre 5 y 20 Gy y simulamos exposiciones parciales entre el 10 y el 90%.

Identificación de irradiaciones parciales simuladas: En la mayoría de las irradiaciones parciales simuladas (SPBI por sus siglas en inglés) el valor del estadístico U fue mayor de 1.96 indicando sobredispersión que es lo esperado en el caso de irradiaciones parciales. Al analizar cada donante individualmente obtuvimos una identificación correcta de las SPBI (i.e.  $u > 1.96$ ) en el 60 % de las muestras del donante 1 y en el 88% de las muestras del donante 3. De las 11 SPBI que no pudieron identificarse, 5 correspondieron a las dosis mas bajas ensayadas: 1 y 5 Gy. El valor de U fue mas elevado en general en las fracciones bajas de SPBI con una tendencia a decrecer con el incremento en el % de sangre irradiada. Cuando se aplico el “modo triage” de conteo de las aberraciones (contando solo 300 células) el numero de identificaciones correctas de las proporciones simuladas bajo al 68 %. La posibilidad de distinguir entre irradiaciones parciales y totales analizando la distribución de anillos PCC entre las células es decisiva para la aplicación de este ensayo en situaciones accidentales. Los resultados obtenidos en este estudio contando un gran número de células y aun limitando el análisis a un menor numero de células son similares a los reportados usando el ensayo del dicéntrico, donde del 86% al 100% de las muestras, en simulaciones de irradiaciones totales y del 60-100% de las muestras, en simulaciones de irradiaciones parciales fueron identificadas correctamente por el valor U. En este trabajo aproximadamente la mitad de las identificaciones erróneas estuvieron entre 1 y 5 Gy, donde la dosis y la fracción irradiada inicialmente conllevan grandes incertidumbres estadísticas debido al pequeño número de aberraciones encontradas (recordar que la aberración anillo es menos frecuente que el dicéntrico).

Estimación de la dosis y la fracción irradiada: Se presentan los resultados obtenidos en las estimaciones de la fracción de sangre irradiada inicialmente para cada donante (ver la figura 5 en la publicación que se adjunta en Anexo 3). Las mejores estimaciones se hicieron con el donante 3 (~ 60% de estimaciones correctas), mientras que las peores fueron con el donante 1 (~50 % correctas) con una tendencia a la sobreestimación de la fracción irradiada. En el presente trabajo analizamos la sangre de tres donantes y consideramos nuestros datos previos sin publicar, que muestran algunas diferencias entre donantes en la respuesta a iguales dosis de radiación, así como pequeñas variaciones interindividuales. Las respuestas de los donantes fueron similares en todo el rango de dosis usado en estos experimentos. Sin embargo, la aparente saturación del ensayo en un donante por encima de los 15 Gy, no obtenida anteriormente utilizando nuestro protocolo, apoya los hallazgos previos encontrados por otros autores, sugiriendo la posibilidad de saturación del ensayo después de los 15 o 20 Gy, lo cual debe ser considerado cuando se sospechen dosis por encima de los 15 Gy. Esto debe ser confirmado extendiendo el intervalo de dosis. Debe destacarse la necesidad de utilizar un número apropiado de donantes para la construcción de curvas de calibración o cuando se simulen irradiaciones parciales *in vitro*, además de considerar las diferencias en los criterios de conteo o los protocolos utilizados. Eso y otros factores como la tasa de dosis, el número de células analizadas, etc. pueden determinar las diferencias en los coeficientes para las relaciones lineales obtenidas para el ensayo PCC-R para las altas dosis de radiación.

Valor Do: El valor de Do obtenido fue de 10.2 Gy utilizando el método de Lloyd et al [11] y de 10.9 Gy según el método de Matsubara [12]. Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas (Student's t-test,  $P > 0.05$ ) entre las estimaciones de las fracciones irradiadas usando los dos valores de Do, una mayor cantidad de fracciones estimadas cayeron en el rango aceptable cuando se utilizó el valor de Do de 10.9 Gy. Este valor debe ser considerado cuando se usa el ensayo en situaciones accidentales, donde se sospeche irradiaciones parciales del cuerpo. El valor obtenido aquí es mucho mayor que los valores de Do reportados previamente para el ensayo del dicéntrico para Rayos X ( $D_0 = 2.7$  y  $D_0 = 3.8$ ) o para irradiación gamma ( $D_0 = 3.5$  y  $D_0 = 3.0$ ). Las diferencias pueden ser explicadas por la naturaleza de los diferentes indicadores medidos en cada ensayo. Mientras que en el ensayo del dicéntrico convencional la Do esta basada en la capacidad de los linfocitos G<sub>0</sub> irradiados para llegar a metafase, la Do medida aquí incluye además otras células capaces de llegar a la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular. El hecho de que en el ensayo PCC-R se analicen células en casi todas las fases del ciclo celular incide también en la mayor frecuencia de anillos por célula detectada en este ensayo comparándolo con el ensayo del dicéntrico donde se analizan únicamente células en metafase. Es de suponer que el uso de diferentes condiciones de cultivo, así como las diferencias en las respuestas a la estimulación de los linfocitos en los cultivos de diferentes donantes influya en los índices mitóticos o el índice PCC y por consiguiente, bajo similares condiciones de irradiación la sobrevivencia de los linfocitos (medida por el número de

metafases o células PCC) pueda variar. Parece razonable sugerir que los valores  $D_0$  deben derivarse individualmente por los laboratorios de dosimetría biológica, como se recomienda en los trabajos realizados sobre este aspecto.

La potencialidad de distinguir entre irradiaciones totales y parciales analizando la distribución de anillos PCC entre las células fue confirmada bajo las condiciones usadas en este estudio. En tales circunstancias es posible aplicar las herramientas desarrolladas para el ensayo del dicéntrico para la estimación de la fracción irradiada y la dosis en dicha fracción. El valor de  $D_0=10.9$  Gy dio los mejores resultados en las estimaciones realizadas.

Se calculó un nuevo valor de  $D_0 = 10.9$  Gy, el cual fue usado para estimar la fracción inicial de células irradiadas. Los resultados presentados aquí indican que con el ensayo PCC – Rch, es posible distinguir entre la irradiación del cuerpo total y parcial, mediante la prueba U, así como estimar de forma precisa la dosis entre 10 – 20 Gy y la fracción inicial de células irradiadas en el intervalo entre 10 – 90%. Todos los detalles de este trabajo aparecen en el Anexo 3.

#### **4) El desarrollo de una escala para la clasificación rápida de personas expuestas a altas dosis de irradiación con neutrones utilizando el “índice PCC”.**

El “índice PCC” permitió discriminar con facilidad 3 grupos de dosis: de 0–1 Gy; de 1–10 Gy; y  $> 10$  Gy, lo cual resulta de utilidad en las estimaciones de dosis para exposiciones con neutrones a dosis extremadamente altas donde las estimaciones se encuentran limitadas por el proceso de saturación observado en la formación de anillos. El índice PCC muestra correlación con la dosis de radiación y decrece con la dosis. Un valor del índice PCC menor que 1 indicó que la dosis de radiación estuvo por encima de 10 Gy. Por estos resultados se propone el “índice PCC” como un biomarcador para la clasificación rápida de personas expuestas a altas dosis de irradiación con neutrones. Los coeficientes de las curvas se dan en la publicación que se adjunta en el Anexo 2. Adicionalmente el índice PCC parece tener una buena correlación con la dosis de radiación y decrece de forma dosis dependiente de 13% en la muestra no irradiada hasta 0.2%. Esta observación brinda la posibilidad de realizar una estimación rápida de las víctimas expuestas a altas dosis de radiación gamma y con neutrones. El ensayo PCC–R puede ser utilizado tanto para la estimación de la dosis recibida por neutrones hasta 4 Gy, como para una rápida clasificación de las víctimas expuestas a altas dosis. Este ensayo puede ser incluido en el enfoque multiparamétrico desarrollado para optimizar el tratamiento médico de la víctimas de radiación.

#### **5) La demostración experimental de que es posible a altas dosis cuantificar anillos y por lo tanto estimar dosis con la técnica de PCC fusión, que es anterior a la PCC química, elimina la necesidad de cultivar los linfocitos, lo cual ofrece el método citogenético más expedito publicado hasta el momento para la estimación de altas dosis en accidentes.**

Nos propusimos extender las experiencias y buenos resultados del conteo de anillos en el PCC-Rch para las altas dosis a la técnica del PCC fusión (PCC-Rf) por su inmediatez, con el fin de poner a disposición de la emergencia un método que permitiera obtener estimaciones de altas dosis de radiación en el menor tiempo.

En el presente trabajo, nosotros presentamos la metodología PCC mediante la fusión de linfocitos en fase Go con células CHO mitóticas, en combinación con la visualización y cuantificación rápida de anillos (PCC-Rf) como el método citogenético más expedito publicado hasta el momento para la estimación de altas dosis en accidentes con radiación gamma en el intervalo de 5-20 Gy.

Es una técnica más rápida que las técnicas clásicas porque no requiere que las células estén en metafase para ser analizadas. Esto representa una gran ventaja ya que a altas dosis los métodos clásicos requieren la concentración de los linfocitos para maximizar el número de metafases y generalmente existe una frecuencia tan alta de dicéntricos que dificulta el análisis.

El protocolo de fusión utilizado probó su efectividad a dosis tan altas como 20 Gy, dando un número suficiente de células PCC con morfología adecuada y permitiendo el análisis de cromosomas en anillos y excesos de fragmentos. Se obtuvo un índice PCC-f de 15.5 % en las células controles (0 Gy) y después de la irradiación con 20 Gy. La frecuencia de PCC-Rf y de fragmentos en exceso se incrementó con el incremento de la dosis. La distribución de los anillos en las células PCC siguió una distribución de Poisson en la mayoría de los puntos experimentales, a pesar de que hubo cierta tendencia a la subdispersión, tendencia más marcada en los linfocitos aislados irradiados. El tiempo necesario para el recuento de 100 PCC-Rf fue alrededor de 2 horas.

La relación obtenida para todas las series experimentales unidas fue:  $Y = (0.088 \pm 0.005) \times D$  lo que muestra su tendencia lineal. Todas las series experimentales probadas tuvieron una pendiente significativa ( $p < 0.05$ ) y una respuesta a la dosis significativa, sin diferencias entre ellas. En el intervalo de 0 a 8 Gy cubierto en publicaciones previas, el mejor ajuste fue con un modelo lineal-cuadrático. Esto no es sorprendente pues se conoce que en la región de las altas dosis, usualmente sin puntos experimentales por debajo de los 5 Gy, la dosis respuesta tiene un mejor ajuste al modelo lineal. Por el contrario, la inclusión de puntos experimentales en las bajas dosis puede obstruir el ajuste lineal o dar resultados similares para ambos ajustes. Sin embargo, en la región de las altas dosis, donde el término cuadrático no es relevante, el uso del modelo lineal parece ser apropiado.

Todos los ensayos citogenéticos descritos anteriormente en la literatura pueden ser aplicados después de 48 horas, tiempo requerido para la estimulación de los linfocitos T. Nuestros resultados muestran que la metodología ofrecida ofrece una alternativa rápida y una estimación de dosis precisa después de sobreexposiciones accidentales a altas dosis de radiación. Este procedimiento combina la visualización prácticamente instantánea de los PCCs en linfocitos en interfase después de colectar las muestras de sangre de los individuos expuestos, con el recuento relativamente fácil y rápido de los anillos. Las

experiencias previas con el ensayo de PCC fusión estuvieron limitados a intervalos de dosis menores de hasta alrededor de 8 Gy.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el protocolo de PCC fusión puede ser aplicado con éxito conjuntamente con el recuento de anillos, en el mismo intervalo de dosis reportado para el ensayo PCC-Rch. Además, esta técnica tiene la ventaja de eliminar los 2 días del cultivo que se requieren para el ensayo PCC-Rch y el ensayo del dicéntrico convencional. El recuento de anillos después de la tinción con Giemsa en el ensayo PCC fusión introduce varias ventajas en comparación con el recuento de fragmentos en exceso utilizado frecuentemente en la dosimetría biológica.

La primera es que se reduce significativamente la complejidad del recuento de los fragmentos PCC, cuya frecuencia es particularmente elevada después de altas dosis de radiación. Los anillos son reconocidos fácilmente, su frecuencia es menor pero aun suficiente para una adecuada exactitud estadística y por consiguiente el recuento es un proceso rápido. Se requieren solamente dos horas como promedio para el análisis de un número apropiado de anillos en los linfocitos PCC, tiempo similar al requerido para el ensayo PCC-Rch.

La segunda ventaja importante es que el problema de la cinética de declinación con el tiempo asociada con los fragmentos en exceso, reportada anteriormente y observada en este trabajo, se resuelve puesto que la formación de los anillos permanece constante después de 8 horas de incubación en las dos condiciones experimentales probadas: linfocitos aislados y sangre total.

La tercera, pero no menos importante, es la distribución de anillos en las células. Los PCC-Rf siguen una distribución de Poisson en la mayoría de los puntos experimentales, como era de esperar para irradiaciones totales uniformes. Esto es consistente con los hallazgos previos en la región de las bajas dosis, introduciendo la posibilidad de identificar irradiaciones parciales mediante el uso de las herramientas reportadas para el análisis citogenético convencional, por ejemplo, el test U. El índice PCC de 15.5% obtenido en las células control (0 Gy) y en las irradiadas con 20 Gy, anticipa que los linfocitos Go dañados y no dañados pueden ser analizados con igual probabilidad.

Finalmente, es importante señalar que el ensayo PCC fusión es aplicado solamente en un número limitado de laboratorios en el mundo. Su aplicabilidad para la dosimetría biológica en la respuesta a emergencia en exposición a radiaciones debe estar precedida por la asimilación del ensayo. La explicación detallada del método se presenta en el Manual del OIEA sobre dosimetría citogenética [1]. Puede obtenerse un número suficiente de células inductoras de mitosis para la aplicación del ensayo, manteniendo los cultivos de células CHO en el laboratorio o utilizando las células CHO congeladas [1].

Nuestros resultados muestran que el ensayo PCC-Rf es apropiado para usarlo como biodosímetro después de exposiciones totales a altas dosis de radiación ionizante. El ensayo cubre un amplio rango de dosis y los resultados pueden ser obtenidos, con una incertidumbre apropiada, en un breve tiempo

después de la recepción de las muestras de sangre de los individuos expuestos sin necesidad de cultivar los linfocitos. Debe señalarse que a pesar de que la automatización y el análisis de imágenes permite un rápido recuento de las aberraciones cromosómicas, este ensayo PCC-Rf puede realizarse directamente bajo el microscopio y ofrece una manera rápida, fácil y segura para la estimación de la dosis.

Las irradiaciones, la fusión y la preparación de los extendidos se realizaron en el laboratorio de citogenética del Instituto Demókritos de Atenas. Las evaluaciones de las muestras preparadas se hicieron en ambos laboratorios, el griego y el cubano. El trabajo publicado con estos resultados se adjunta en el Anexo 4.

## **CONCLUSIONES**

1) **Cuba es pionera en obtener curvas PCC-Rch en un amplio rango de dosis de irradiación Gamma y no se conoce que existan curvas para la irradiación con neutrones además de la nuestra.** Las curvas dosis respuesta de los nuevos indicadores incorporados al servicio de dosimetría biológica permiten estimar dosis totales y parciales en un intervalo entre 0,1 Gy y 25 Gy para radiación gamma y entre 1 Gy y 4 Gy para irradiación neutrónica. Además, con el índice PCC-Rch es posible clasificar rápidamente **exposiciones a neutrones mayores de 10 Gy.** Esto nos convierte en pioneros en el uso de estos indicadores al reportar por vez primera las ecuaciones matemáticas que correlacionan altas dosis de radiaciones con la frecuencia de PCC-Rch.

2) Nuestros resultados muestran que el ensayo PCC fusión es apropiado para su uso como dosímetro biológico después de exposición total a altas dosis de radiación gamma en un amplio rango de dosis de 5-20 Gy y los **resultados pueden ser obtenidos, con una incertidumbre apropiada, en un breve tiempo después de la recepción de las muestras** de sangre de los individuos expuestos sin necesidad de cultivar los linfocitos.

3) La Dosimetría Biológica en el país puede realizar actualmente la **estimación ágil y precisa de la dosis de radiación absorbida en personas expuestas a altas dosis** de radiación, que antes de la realización de estos estudios no eran alcanzables, lo cual es un elemento primario para seleccionar el tratamiento médico más adecuado para salvar la vida de las personas afectadas.

4) Esta respuesta profesional y altamente calificada **contribuye directamente al sistema de respuesta a emergencias radiológicas** que ha creado el país en caso de ocurrir contingencias y amplía las posibilidades de contribuir al esclarecimiento de cualquier suceso radiológico anormal

que pueda ocurrir en la región, pues Cuba ha comenzado a extender la técnica PCC-Rch a los restantes laboratorios de dosimetría biológica en América Latina.

5) El desarrollo alcanzado en la Dosimetría Biológica por el Laboratorio de Radiobiología del CPHR se refleja en resultados prácticos que **nos ubican entre los países con capacidad para realizar estimaciones dosimétricas** utilizando un conjunto indicadores citogenéticos en casos de accidentes nucleares o radiológicos.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la AENTA/CITMA como parte de dos Proyectos Ramales Nucleares, así como por el Proyecto Regional RLA9061 y el IRSN de Francia.

## Bibliografía

1. IAEA. Technical Reports Series No. 405 Cytogenetic analysis for radiation dose assessment a manual. Vienna: IAEA, 2001.
2. E. GOTOH, A. ASAKAWA, H. KOSAKA, Inhibition of protein serine/threonine phosphatases directly induces premature chromosome condensation in mammalian somatic cells, Biomed. Res. (1995) 16, 63–68.
3. KANDA R, HAYATA J, LLOYD DC. Easy biodosimetry for high-dose radiation exposures using drug-induced, prematurely condensed chromosomes. Int. J. Radiat. Biol. 1999; 75(4): 441-446.
4. LAMADRID AI, GARCIA O, DELBOS M, et al. PCC-ring induction in human lymphocytes exposed to gamma and neutron irradiation. J. Radiat. Res. 2007; 48(1): 1-6.
5. GOTOH E, TANNO Y, TAKAKURA K. Simple biodosimetry method for use in cases of high dose radiation exposure that scores the chromosome number of giemsa-stained drug-induced prematurely condensed chromosomes (PCC). Int J Radiat Biol. 2005; 81(1): 33-40.
6. R.T. JOHNSON, P.N. RAO, Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei, Nature (1970), 226 717–722.
7. G.E. Pantelias, H.D. Maillie, A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol, Somatic Cell Genet. (1983), 9, 553–647.
8. LINDHOLM C, et. al. Premature chromosome condensation (PCC) assay for dose assesment in mass casualty accidents. Radiat. Res. 2010; 173 (1): 71-78.
9. PAPWORTH DG. Appendix in: Savage J.R.K. Sites of radiation induced chromosome exchanges. Curr. Top. Radiat. Res. 1970; 6: 129-194.
10. PAPWORTH DG. Curve fitting by maximum likelihood. Radiat. Bot. 1975; 15: 127-131.



11. LLOYD D-C, PURROTT R-J, DOLPHIN G-W. Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation. *Phys Med Biol* 1973;18:421–31.
12. MATSUBARA S, SASAKI M-S, ADACHIT T. Dose–response relationship of lymphocytes chromosome aberrations in locally irradiated persons. *J Radiat Res* 1974;15:189–96.
13. E.A. AINSBURY, D.C. LLOYD, Dose estimation software for radiation biodosimetry, *Health Phys.* (2010) 98, 290–295.
14. WANG Z-Z, ET AL Biodosimetry estimate for high-LET irradiation. *Radiat Envirom Biophys* (2007) 46: 229–235.
15. DOLPHIN G-W. Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. In: IAEA (ed). *Handling of Radiation Accidents. Proceedings of the International Symposium, Vienna, 1969*, 215–24.

#### **5. Acreditación de la introducción del resultado y de su impacto en la sociedad.**

Los resultados obtenidos en este trabajo están introducidos en el país, y forman parte del arsenal que tiene el país para la respuesta ante emergencias. El Consejo Científico del CPHR acredita que los resultados están introducidos en la cartera de servicios científico-técnicos que se brindan, y además forman parte del Servicio Estatal de Dosimetría Citogenética para la respuesta a emergencias radiológicas (ver Dictamen del Consejo Científico en el Anexo 6).

Estos resultados se encuentran generalizados pues son aplicables a todo el territorio nacional, ya que este es un servicio que se brinda a todo el país, además mediante varios proyectos internacionales del OIEA relacionados en el Anexo 9.

Se ha comenzado su extensión a otros laboratorios de dosimetría biológica de la región (ver Curso Regional en el Anexo 7) y se encuentran ampliamente referenciados en la literatura, lo que ha servido para extender la técnica a nivel internacional (Anexo 7). Por otra parte estos resultados han sido presentados en varios eventos científicos (Anexo 10).

Los resultados obtenidos son congruentes con la política de ciencia, tecnología innovación y medio ambiente ambiental definida en los lineamientos de la política económica y social del Partido y la Revolución aprobados en el VI en Congreso del PCC, específicamente con el lineamiento 131 que llama a sostener y desarrollar los servicios científicos y tecnológicos de alto valor agregado, así como con el lineamiento 138 que llama a prestar mayor atención en la formación y capacitación continua del personal técnico y cuadros calificados que respondan y se anticipen al desarrollo científico y tecnológico en las principales áreas de la producción y los servicios.

#### **6. En los Anexos 1 al 5 se adjuntan las copias de las publicaciones científicas en órganos de reconocido prestigio.**

7. En el **Anexo 6** se adjuntan los dictámenes de consejo científico: Dictamen **del órgano científico** de la institución donde se discutió el trabajo que acredita la importancia y valor para la ciencia y la tecnología del aporte del resultado y anexos 1 y 2 del Resultado

## ANEXO 1

LAMADRID AI, GARCÍA O., DELBOS M., VOISIN P. and ROY L. (2007) PCC-ring induction in human lymphocytes exposed to gamma and neutron irradiation. *Journal of Radiation Research* **48**: 1-6.

**Traducción del resumen del artículo:** LAMADRID AI, GARCÍA O., DELBOS M., VOISIN P. and ROY L. (2007) PCC-ring induction in human lymphocytes exposed to gamma and neutron irradiation. *Journal of Radiation Research* **48**: 1-6.

En caso de una sobre-exposición a radiaciones ionizantes, donde la dosis recibida por la víctima es superior a 5 Gy, el indicador biológico convencional para estimar la dosis, el ensayo del dicéntrico, no permite realizar una estimación lo suficientemente precisa de la dosis. Una técnica más apropiada es cuantificar los anillos en cromosomas en linfocitos estimulados. Las curvas dosis – respuesta fueron obtenidas trazando las frecuencias de Anillos en Cromosomas Prematuramente Condensados (PCC – R, por sus siglas en inglés), en linfocitos PCC obtenidos por inducción química con Calyculina A, *in vitro*, irradiados con dosis entre 5 – 25 Gy. Las células fueron expuestas a radiación gamma o neutrónica, y sus correspondientes curvas dosis – respuesta son presentadas en este artículo, por primera vez en la literatura. Para la elaboración de estas curvas fueron analizadas 9 675 células PCC en las fases G1, G2 y M/A. los resultados fueron ajustados a un modelo lineal hasta 25 Gy, para radiación gamma. Para radiación con neutrones, los datos fueron ajustados a un modelo lineal hasta 10 Gy, a partir de la cual se observó una saturación de la dosis. en conclusión, con esta técnica es posible establecer curvas dosis – respuesta hasta 25 o 10 Gy según el tipo de radiación gamma o neutrones.

## ANEXO 2

LAMADRID AI, GONZÁLEZ JE., GARCÍA O., VOISIN P. and ROY L. (2011) Prematurely Condensed Chromosome Rings after Neutron Irradiation of Human Lymphocytes. *Journal of Radiation Research* **52**: 531–535.

**Traducción del resumen del artículo:** LAMADRID AI, GONZÁLEZ JE., GARCÍA O., VOISIN P. and ROY L. (2011) Prematurely Condensed Chromosome Rings after Neutron Irradiation of Human Lymphocytes. *Journal of Radiation Research* **52**: 531–535.

Las curvas de calibración para los neutrones de fisión y otras radiaciones de alta LET, son escasas en la dosimetría citogenética, y particularmente para el ensayo de Anillos en Cromosomas Condensados Prematuramente (PCC – R, por sus siglas en inglés). En este artículo analizamos el comportamiento de la frecuencia de PCC – R y el índice PCC después de la irradiación con neutrones en un amplio intervalo de dosis (1 – 26 Gy). Los PCC – R fueron inducidos con Calyculina A. Fueron analizadas 6 455 células PCC en las fases G1, G2/M y M/A. El mejor ajuste entre la frecuencia de PCC – R (Y) y la Dosis (D) fue el obtenido con la ecuación  $Y = (0.059 \pm 0.003) \bullet D$ . La saturación de los PCC – R se observó alrededor de los 4 Gy, sin embargo fue posible analizar células expuestas hasta los 26 Gy. Las distribuciones de los anillos por célula fueron del tipo Poisson o Neyman, para todas las dosis. Esta curva dosis - respuesta puede ser utilizada en el caso de una sobre-exposición accidental a radiación neutrónica, permitiendo la estimación de la dosis de forma confiable. Adicionalmente el índice PCC parece tener una buena correlación con la dosis de radiación y decrece de forma dosis dependiente de 13% en la muestra no irradiada hasta 0.2%. Esta observación brinda la posibilidad de realizar una estimación rápida de las víctimas expuestas a altas dosis de radiación gamma y con neutrones. El ensayo PCC – R puede ser utilizado tanto para la estimación de la dosis recibida por neutrones hasta 4 Gy, así como para una rápida clasificación de las víctimas expuestas a altas dosis. Este ensayo puede ser incluido en el enfoque multiparamétrico desarrollado para optimizar el tratamiento médico de la víctimas de radiación.

### ANEXO 3

ROMERO I, GARCÍA O, LAMADRID AI, GREGOIRE E, GONZÁLEZ JE, MORALES W, MARTIN C, BARQUINERO JF, VOISIN P (2013) Assessment of simulated high-dose partial-body irradiation by PCC-R assay. *Journal of Radiation Research*, 54: 863-871.

**Traducción del resumen del artículo: ROMERO I, GARCÍA O, LAMADRID AI, GREGOIRE E, GONZÁLEZ JE, MORALES W, MARTIN C, BARQUINERO JF, VOISIN P (2013) Assessment of simulated high-dose partial-body irradiation by PCC-R assay. *Journal of Radiation Research*, 54: 863-871.**

La estimación de la dosis y de la fracción del cuerpo irradiada es una información importante en la respuesta médica primaria, en el caso de un accidente radiológico. El ensayo PCC – Rch ha sido desarrollado para la estimación de las altas dosis, sin embargo se le ha dedicado poca atención a su aplicabilidad en las irradiaciones parciales. En el presente trabajo estimamos la dosis y el porcentaje de la fracción irradiada en simulaciones de irradiación corporal parcial a altas dosis usando el ensayo PCC – R. La sangre periférica de tres donantes sanos fue expuesta a dosis entre 0 – 20 Gy con una fuente de irradiación gamma  $^{60}\text{Co}$ . Para simular la irradiación de cuerpo parcial, se mezcló sangre irradiada con sangre no irradiada hasta obtener las proporciones entre 10 – 90% de sangre irradiada. Antes de terminar el cultivo, los cultivos de linfocitos fueron tratados con Colcemid y Calyculina A. Se realizaron la cuantificación convencional y en triage, para cada dosis, proporción de sangre irradiada y donante. Para evaluar la distribución de anillos en PCC por célula se utilizó la prueba  $u$  de Papthworth. Utilizando las frecuencias de PCC – Rch, obtenidas para el 100 % de sangre irradiada, se ajustó una curva dosis – respuesta siguiendo el método de máxima verosimilitud. La dosis de la sangre parcialmente irradiada, fue estimada usando el método de Poisson Contaminado. Se calculó un nuevo valor de  $D_0$ , el cual fue usado para estimar la fracción inicial de células irradiadas. Los resultados presentados aquí indican que con el ensayo PCC – Rch, es posible distinguir entre la irradiación del cuerpo total y parcial, mediante la prueba  $u$ , así como estimar de forma precisa la dosis entre 10 – 20 Gy y la fracción inicial de células irradiadas en el intervalo entre 10 – 90%.



#### ANEXO 4

LAMADRID AI, ROMERO I, TERZOUDI GI, GONZÁLEZ JE, PANTELAS G, GARCÍA O  
(2013) Rapid assessment of high-dose radiation exposures through scoring of cell-fusion-induced premature chromosome condensation and ring chromosomes. *Mutation Research* 757: 45-51

**Traducción del resumen del artículo:** LAMADRID AI, ROMERO I, TERZOUDI GI, GONZÁLEZ JE, PANTELIAS G, GARCÍA O (2013) Rapid assessment of high-dose radiation exposures through scoring of cell-fusion-induced premature chromosome condensation and ring chromosomes. *Mutation Research* 757: 45-51

Se propone el análisis de la condensación prematura de los cromosomas (PCC) mediante la fusión de linfocitos en fase Go con células CHO mitóticas, en combinación con la visualización y cuantificación rápida de anillos (PCC-Rf) como una técnica alternativa para la estimación de dosis en individuos expuestos a las radiaciones. Se irradiaron los linfocitos aislados o la sangre total de 6 individuos a 5, 10, 15 y 20 Gy, con una tasa de dosis de 0.5 Gy/min. Se prepararon las extensiones para su análisis por los procedimientos citogenéticos estándar, a las 8 ó 24 horas de incubación a 37 C después de la irradiación.. El protocolo PCC fusión utilizado probó su efectividad a dosis tan elevadas como 20 Gy, permitiendo el análisis de los cromosomas en anillo y los fragmentos PCC en exceso. La frecuencia de anillos permaneció constante durante los tiempos de reparación de 8 y 24 horas. La relación dosis-efecto entre la frecuencia de anillos (Y) y la dosis (D) fue lineal:  $Y = (0.088 \pm 0.005) \times D$ . Durante el tiempo de reparación los fragmentos en exceso decrecieron de 0.91 a 0.59 piezas cromatídicas /Gy, revelando la importancia de la información acerca del tiempo exacto de la exposición en la estimación de la dosis basada en los fragmentos. Las ventajas del PCC-Rf respecto a otros ensayos citogenéticos para la estimación de la dosis de radiación son las siguientes: 1) no requiere un tiempo de cultivo de 48 horas, permitiendo una estimación mucho mas rápida en comparación con el conteo convencional de dicéntricos y anillos en ensayos de condensación prematura de cromosomas químicamente inducidos (PCC-Rch), y 2) permite el análisis de linfocitos fuertemente dañados que están retardados o nunca alcanzan la mitosis, por lo tanto evita el problema de la saturación a altas dosis. En conclusión, el uso del ensayo PCC fusión conjuntamente con el recuento de anillos en linfocitos en fase Go ofrece una alternativa adecuada para la estimación rápida de la dosis en exposiciones accidentales a altas dosis de radiación.

## ANEXO 5

LAMADRID AI, MANDINA T, GONZÁLEZ JE, ROMERO I, GARCÍA O (2011) Nuevas curvas de calibración para la dosimetría biológica en Cuba. *Nucleus* **49**:3-8.

## ANEXO 6

Dictámenes del Consejo Científico del CPHR



## Dictamen del Consejo Científico

Dictamen No. 1-10/ Año: 2013

**Título del Resultado: DOSIMETRÍA CITOGÉNÉTICA PARA ALTAS DOSIS DE RADIACION MEDIANTE CONDENSACION PREMATURA DE CROMOSOMAS.**

**Autores:** Ana Ilsa Lamadrid Boada, Ivonne romero Aguilera, Jorge Ernesto González y Omar García Lima.

**Alcance o Nivel del Resultado:** Premio de la Academia de Ciencias de Cuba

1.- Correspondencia de la información presentada con el formato establecido, los objetivos y resultados previstos.

El documento presentado cumple con los requerimientos que para este tipo de premio tiene establecido la Academia de Ciencias de Cuba. Se ha elaborado siguiendo estrictamente los acápites pedidos en la convocatoria. Posee una planilla con los datos generales del resultado, donde se refleja la entidad ejecutora principal, los autores y la contribución de los mismos. El resumen da una idea clara del problema que resuelve el trabajo, así como de los resultados obtenidos por los autores. En el acápite 3 Comunicación corta sobre el resultado, los autores, en un estilo original y práctico ofrecen una explicación resumida de la utilización de las técnicas de condensación prematura de los cromosomas y sus modificaciones para la estimación de altas dosis de radiación, acompañado de referencias a los artículos publicados, que se anexan, lo cual facilita la comprensión del trabajo con una economía significativa de recursos. El resultado tiene un número apropiado de anexos que incluyen los artículos publicados entre el 2007 y el 2013, avales de su introducción y otros documentos referenciados en la Descripción e Informe del Resultado.

2.- Rigor técnico, importancia y valor para la ciencia y la tecnología del aporte del resultado.

El trabajo ha sido realizado con un alto rigor técnico, que se manifiesta en la obtención de resultados originales que aparecen publicados en revistas de alto prestigio internacional y elevado factor de impacto. La importancia y valor para la ciencia y la tecnología de estos resultados son altísimos pues aportan resultados primarios de utilidad práctica para la aplicación de esta técnica en situaciones accidentales reales. Un reflejo de la importancia que le ha atribuido la comunidad científica internacional a estos resultados esta expresada en la profusión de artículos de autores de varios países que citan los resultados obtenidos por los investigadores cubanos y la inclusión de referencias a estos trabajos en el ultimo manual del OIEA sobre dosimetría citogenética.

### 3.- Conclusiones y recomendaciones.

Por lo anteriormente expuesto el Consejo Científico del CPHR acordó por unanimidad recomendar que el resultado presentado sea sometido a la consideración de los órganos competentes para su valoración como Premio de la Academia de Ciencias por su aporte científico

Nombre y apellidos del Presidente del Consejo Científico:  
Juan Cárdenas Herrera

Firma:



Fecha: 7 de octubre de 2013

## Anexo 1

### **1-Denominación del resultado: DOSIMETRÍA CITOGENÉTICA PARA ALTAS DOSIS DE RADIACION MEDIANTE CONDENSACION PREMATURA DE CROMOSOMAS**

#### **2-Relación de autores del resultado. Valoración de la participación de cada uno de ellos**

**Autor principal:** Ana Ilsa Lamadrid Boada: Es la primera autora de 4 de los artículos que soportan el resultado. Trabajó en el diseño y la concepción del trabajo y ejecutó la mayoría de trabajo experimental realizado. Ejecutó tareas técnicas dentro de los proyectos asociados al resultado. Participó en la concepción y formulación del resultado, de los artículos científicos publicados y salidas de proyectos. Hizo las presentaciones de los resultados obtenidos en eventos científicos. Filiación: CPHR. % de participación: 40

#### **Otros Autores:**

Ivonne Romero Aguilera: Es la primera autora de uno de los artículos que soportan este resultado. Participó en el diseño y la concepción del trabajo. Realizó tareas técnicas asociadas al resultado. Participó en la escritura del resultado y de un artículo científico publicado así como también la escritura de los informes y salidas de proyectos. Hizo presentaciones de resultados en eventos científicos. Filiación: CPHR. % de participación: 20

Jorge Ernesto González Mesa: Realizó tareas técnicas asociadas al resultado. Participó en la escritura del resultado y de los artículos científicos publicados. Filiación: CPHR. % de participación: 20

Omar García Lima: Propuso la realización del trabajo y dirigió los principales proyectos que dieron origen al resultado. Participó en el diseño y la concepción del trabajo. Realizó las coordinaciones iniciales con las diferentes contrapartes extranjeras donde se realizaría parte del trabajo experimental. Participó en la escritura de este resultado y de los artículos que lo acompañan. Actuó como experto en la nueva versión del manual del OIEA sobre dosimetría citogenética. Filiación: CPHR. % de participación: 20

**3- Entidad que obtiene el resultado:** Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones.

**4- Entidad introductora del resultado:** Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones.

#### **5- Aporte científico y actualidad del resultado:**

El nuevo problema que esta enfrentando la dosimetría biológica es la capacidad de dar una respuesta efectiva e inmediata a la necesidad de obtener información dosimétrica en situaciones de

exposición no planificadas a altas dosis de radiación. Este escenario, que ha emergido como resultado de accidentes radiológicos severos ocurridos en los últimos años y de la posibilidad de acciones malévolas en el que estén implicados materiales radioactivos, ha impulsado al Servicio de dosimetría biológica del CPHR al desarrollo de nuevos métodos biológicos para las estimaciones de dosis mediante investigaciones novedosas que lo mantienen en el estado del arte.

Con la concepción de las técnicas analíticas, la obtención de estas curvas de calibración para la estimación de altas dosis y su validación se adquirieron las posibilidades técnicas para ejecutar la dosimetría biológica de altas dosis en situaciones accidentales que potencialmente pueden ocurrir en el país y ampliar nuestro aporte a la red de laboratorio del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) en América Latina que participa en la respuesta a accidentes de estas características. Este hecho además de su impacto científico, tiene un importante aporte social ya que garantiza la estimación de dosis en un tiempo mucho menor que con la dosimetría convencional, lo cual permite tomar acciones clínicas para mejorar la salud de las víctimas y su pronóstico de vida.

Los resultados obtenidos son congruentes con la política de ciencia, tecnología innovación y medio ambiente ambiental aprobados en el VI en Congreso del PCC, específicamente con el lineamiento 131 que llama a sostener y desarrollar los servicios científicos y tecnológicos de alto valor agregado, así como con el lineamiento 138 que llama a prestar mayor atención en la formación y capacitación continua del personal técnico y cuadros calificados que respondan y se anticipen al desarrollo científico y tecnológico en las principales áreas de la producción y los servicios.

Las publicaciones que posee avalan su importancia desde el punto de vista científico y garantizan su difusión en la comunidad científica internacional. Las citas de estos artículos en otras publicaciones demuestran el reconocimiento de los laboratorios de dosimetría biológica del mundo así como su actualidad y aplicabilidad.

**6- Fecha de la presente certificación:** 7 de Octubre de 2013



Dr. Juan Cárdenas Herrera  
Presidente Consejo Científico  
Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones



## **Anexo 2**

### **CERTIFICACION DE INTRODUCCION DE RESULTADO CIENTIFICO TÉCNICO**

**1-Denominación del resultado: DOSIMETRÍA CITOGENÉTICA PARA ALTAS DOSIS DE RADIACION MEDIANTE CONDENSACION PREMATURA DE CROMOSOMAS**

**2-Relación de autores del resultado.**

**Ana Ilsa Lamadrid Boada, Ivonne Romero Aguilera, Jorge Ernesto González Mesa, Omar García Lima:** El autor y los miembros de su equipo implementaron en el Servicio de Dosimetria Citogenética del CPHR las técnicas para realizar la dosimetria citogenética que permiten la estimación de altas dosis de radiación.

**3- Entidad que obtiene el resultado:** Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones.

**4- Entidad introductora del resultado:** Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones.

**5- Año en que se introdujo en la práctica social** 2013

**6- Aporte social e introducción del resultado.**

Los resultados obtenidos en este trabajo están introducidos en el país, y forman parte de las capacidades analíticas con que cuenta Cuba para la respuesta a situaciones de emergencias radiológica que provoquen la sobre exposición de personas. El Consejo Científico del CPHR acredita que los resultados están introducidos en la cartera de servicios científico-técnicos que se brindan, y además forman parte del Servicio Estatal de Dosimetría Citogenética que soporta la respuesta a emergencias radiológicas.

Estos resultados se encuentran generalizados pues su asimilación por el servicio de dosimetria citogenética garantiza que sean aplicables a todo el territorio nacional, ya que este es un servicio que se brinda a todo el país. Adicionalmente, mediante varios proyectos internacionales del OIEA, se ha comenzado la extensión de estas técnicas y procedimientos a otros laboratorios de dosimetría biológica de la región. Por otra parte estos resultados se encuentran ampliamente referenciados en la literatura, lo que ha servido para extender la técnica a nivel internacional.

**7-Fecha de la presente certificación:** 7 de octubre de 2013

MSc, Gladys Mercedes López Bejerano  
Directora General  
Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones

## ANEXO 7

Relación de los artículos donde han sido citados los trabajos de los primeros años (Lamadrid *et al.*, 2007; Lamadrid *et al.*, 2011).

Certificación de “Curso Regional de Capacitación sobre la Técnica de condensación prematura de los cromosomas (PCC) inducida químicamente”

## Anexo 8

***Resultado Científico - Técnico de Organismo*** “Cromosomas en anillo condensados químicamente amplían las posibilidades de la Dosimetría Citogenética”.

## ANEXO 9

### **Ejecución de proyectos que dieron lugar al resultado**

#### ***Nacionales:***

1. PRN/6-3/6-2004 “Desarrollo y aplicación de nuevas herramientas para la Protección Radiológica”
2. PRN/5-5/1 “La dosimetría citogenética en el fortalecimiento de la respuesta a emergencias radiológicas”

#### ***Internacionales:***

1. RLA/09/054 Proyecto Regional OIEA “Strengthening National Systems for Preparedness and Response to Nuclear and Radiological emergency”
2. Proyecto Bilateral Cuba-Francia para el “Desarrollo e Implementación de Nuevas Herramientas en la Dosimetría Biológica”(2004-2006)
3. RLA/09/061 Proyecto Regional OIEA “Strengthening National Systems for Preparedness and Response to Nuclear and Radiological Emergency” (TSA5)
4. RLA/09/074 Proyecto Regional OIEA “Strengthening National Systems for Preparedness and Response to Nuclear and Radiological Emergency” (TSA5)
5. FO-AR N° 6148 “Fortalecimiento de las capacidades de respuesta de la dosimetría biológica ante exposiciones accidentales a radiaciones ionizantes”

## ANEXO 10

### **Presentación del resultado en eventos nacionales e internacionales**

1. VI Taller Nacional y III Internacional de Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis (MTC-**2006**), La Habana: “PCC -Ring dose effect curves in human lymphocytes exposed to gamma and neutron irradiation”.
2. 1er Congreso Panamericano IRPA Acapulco **2006**, México: “PCC-ring induction in Human Lymphocytes exposed to Gamma and Neutron Irradiation”.
3. IRPA 12th, Buenos Aires **2008**, Argentina: “PCC-ring induction in Human Lymphocytes exposed to Gamma and Neutron Irradiation”.
4. VII Taller Nacional y IV Internacional de Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis (MTC-**2009**) La Habana: “Curva dosis-respuesta de PCC-R en linfocitos humanos irradiados in vitro a diferentes dosis de neutrones”.
5. EPR Biodose Congress Mendelieu **2010**, Francia: “Prematurely condensed chromosome rings after neutron irradiation of human lymphocytes”.
6. EPR Biodose Congress Leiden 2013, Holanda: “Dose assessment by PCC-R assay of simulated partial-body irradiation at high doses”.