

**FACULTAD DE MEDICINA- UNIVERSIDAD DE MURCIA
Area de Radiología y Medicina Física**

Memoria de Tesis Doctoral



**“ EFECTO GENOTÓXICO DE DIFERENTES
TIPOS DE RADIACIONES IONIZANTES
UTILIZADAS EN EXPLORACIONES DE
RADIODIAGNÓSTICO MÉDICO Y MEDICINA
NUCLEAR”**

JOSE LUIS NAVARRO FERNANDEZ

Febrero 2002

AGRADECIMIENTOS

A D. Miguel Alcaraz Baños, Profesor Titular de Radiología y Medicina Física por haber aceptado dirigirme en este trabajo de investigación y por su constante apoyo, constancia y orientación que han permitido la realización del mismo.

A la Dra. Beatriz Rosa Nieto y el Dr. D Alfonso Gómez Moraga, por su especial consejo y ayuda al inicio de esta investigación y posteriormente a lo largo de todo su desarrollo.

Al Dr. Nuño de la Rosa, Dra. Claver, Dr. Sanz, Dr. Nicolás, Dr. Contreras y Dr. Fuente, del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, por el apoyo y estímulos prestados en todo momento.

Al licenciado en Química, D. Manuel Rodríguez Gago en quien siempre encontré la colaboración que necesite.

Al Dr. José Yelamos, y colaboradores de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca por permitirme el acceso reiterado y la utilización de las dependencias e instrumental de la Unidad.

A la Dra. Antonia Bernabéu Esclapez, Directora del Servicio de Cultivos Celulares de la Universidad de Murcia, y a D. José Muñoz Ramos por su asistencia en la obtención del material necesario y por sus enseñanzas prácticas.

Al profesor D. Manuel Canteras Jordana, Catedrático de Bioestadística, y a la D^a Matilde Campos Aranda, Profesora Titular de Bioestadística, por su ayuda en el análisis e interpretación de los resultados.

A D. José Manuel Felices Abad, D. David Armero Barranco, y D. Fernando Bernal Páez de la Unidad de Radiología Vasculat Intervencionista del Hospital General Universitario de Murcia, por facilitarme la obtención de muestras necesarias y su trato amable y desinteresado.

A D^a Pilar Polo, D^a María Sánchez, D Francisco Sánchez, D^a Carmen Martínez, D Enrique Hernández, y al resto del personal del Servicio de Medicina Nuclear, por su desinteresada colaboración, trato amable y ayuda obtenida.

A Rocio, María José y Cristina compañeras del Departamento de Radiología y Medicina Física por su ayuda y apoyo en la realización de este trabajo.

A mis padres por su ayuda

A mi esposa, por su apoyo constante y paciencia

INDICE

<u>CAPITULO I. JUSTIFICACIÓN</u>	1
<u>CAPITULO II. OBJETIVOS</u>	4
<u>CAPITULO III. INTRODUCCIÓN</u>	6
III.1. INTERÉS DE LA DOSIMETRÍA BIOLÓGICA.	6
III.2. NATURALEZA, NECESIDAD Y REQUERIMIENTOS DE LOS DOSÍMETROS BIOLÓGICOS	8
III.2.1. ENSAYOS DISPONIBLES EN LA ACTUALIDAD Y DESARROLLOS FUTUROS	11
III.2.1.1. Observaciones Clínicas	11
III.2.1.2. Indicadores Hematológicos	11
III.2.1.3. Ensayos citogenéticos	13
III.2.1.3.1. Cromosomas de los linfocitos en metafase	13
III.2.1.3.2. Técnica de micronúcleos	15
III. 2.1.3.3. Condensación prematura de cromosomas (PPC)	16
III. 2.1.3.4. Intercambio de cromátidas hermanas (SCE)	16
III.2.1.4. Indicadores Bioquímicos	17
III.2.1.5. Resonancia del spin electrónico	18
III.2.1.6. Indicadores en exposiciones internas	18
III.2.1.7. Indicadores para daños locales	19
III.2.2. TENDENCIAS FUTURAS EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO	
III.2.2.1. Mutaciones genéticas	21
III.2.2.2. Fenómenos celulares	22
III.2.2.3. Indicadores Inmunológicos	24
III.3. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS	28
III.3.1. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN MEDULA ÓSEA DE RATÓN	32
III.3.2. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS DE SANGRE HUMANA	34
III.3.2.1.Preparación del cultivo de linfocitos con citoplasma destruido	35
III.3.2.2.Preparación del cultivo de linfocitos con citoplasma preservado	38
III.3.2.3.Procedimiento modificado de coloración arlequin	38
III.3.2.4.Método autoradiográfico	39
III.3.2.5 Técnica del bloqueo citocinético	40

III.3.2.6 Factores determinantes en la medida de la frecuencia de micronúcleos	43
III.3.2.1.1. El cultivo celular de linfocitos	44
III.3.2.1.2. La conservación del citoplasma celular	46
III.3.2.1.3. Las técnicas de coloración utilizadas	47
III.3.2.1.4. Los criterios de recuento de micronúcleos	47
III.3.2.1.5. Los criterios de identificación de micronúcleos	49
III.3.2.1.6. El tiempo de cultivo celular	49
III.3.2.1.7. La frecuencia de aparición espontánea de micronúcleos en la muestra estudiada	50
III.3.2.7. Situación actual de la Técnica de Micronúcleos	51
<u>CAPITULO IV. MATERIAL Y METODO</u>	
IV.1. EXPOSICIÓN GENERAL. PROTOCOLO GENERAL	58
IV.2. DETERMINACIÓN DE LAS CURVAS	59
IV.2.1. Inducción de micronúcleos con rayos X	59
IV.2.2. Inducción de micronúcleos con rayos gamma	61
IV.2.3. Inducción de micronúcleos en muestras sanguíneas tratadas con Sustancias antioxidantes	64
IV.2.3.1. Muestras controles	66
IV.2.3.2. Muestras tratadas con DMSO	66
IV.2.3.3. Muestras tratadas con rutina	67
IV.2.3.4. Muestras tratadas con diosmina	67
IV.2.3.5. Muestras tratadas con P90	68
IV.2.3.6. Muestras tratadas con vitamina C	69
IV.3. INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN PACIENTES EXPUESTOS A RADIACIÓN IONIZANTE	70
IV.3.1. Inducción de micronúcleos en pacientes irradiados en Radiodiagnóstico	70
IV.3.2. Inducción de micronúcleos en pacientes irradiados en exploraciones diagnósticas de Medicina Nuclear	75
IV.3.3. Inducción de micronúcleos en pacientes irradiados en actividades terapéuticas en Medicina Nuclear	77
IV.4. TÉCNICA DE CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS	80
IV.4.1. Preparación de la Fitohemaglutinina	84
IV.4.2. Preparación de la Citochalcasina	84

IV.5. DETERMINACIÓN FÍSICA DE LA DOSIS DE RADIACIÓN	85
IV.6. DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS	87
IV.7. MORFOMETRÍA DE LOS MICRONÚCLEOS	90
IV.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	90
IV.8.1. Factor de protección	92
IV.8.2. Dosis Equivalente Corporal Total (DECT)	92

CAPITULO V. RESULTADOS

RESUTADOS FUNCIONALES

V.1. DETERMINACIÓN DE LAS CURVAS DOSIS-RESPUESTA	93
V.1.1. Inducción de micronucleos por radiación X. Irradiación “in vitro”	93
V.1.1.1. Determinación de la dosis de radiación	94
V.1.1.2. Frecuencia de micronucleos	94
V.1.1.3. Análisis estadístico	94
V.1.2 Inducción de micronucleos por radiación gamma . Irradiación “in vitro”	96
V.1.2.1 Determinación de la dosis de radiación	96
V.1.2.2 Frecuencia de micronucleos	96
V.1.2.3 Análisis estadístico	96
V.1.3. Inducción de micronucleos en linfocitos humanos: Administración de sustancias antioxidantes antes de la exposición a radiación (grupo preirradiación)	98
V.1.3.1. MUESTRAS CONTROLES	98
V.1.3.2. MUESTRAS TRATADAS CON DMSO	99
V.1.3.3. MUESTRAS TRATADAS CON RUTINA	100
V.1.3.4. MUESTRAS TRATADAS CON DIOSMINA	100
V.1.3.5. MUESTRAS TRATADAS CON P90	101
V.1.3.6. MUESTRAS TRATADAS CON VITAMINA C	102
V.1.3.7. FACTOR REDUCTOR DE DOSIS	102
V.1.3.8. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	103
V.1.4. Inducción de micronucleos en linfocitos humanos: Administración de sustancias antioxidantes tras la exposición a radiación (grupo postirradiación)	104
V.1.4.1. MUESTRAS TRATADAS CON DMSO	104
V.1.4.2. MUESTRAS TRATADAS CON RUTINA	105
V.1.4.3. MUESTRAS TRATADAS CON DIOSMINA	105

V.1.4.4. MUESTRAS TRATADAS CON P90	106
V.1.4.5. MUESTRAS TRATADAS CON VITAMINA C	106
V.1.4.6. FACTOR DE PROTECCIÓN	107
V.1.4.7. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	107
V.2. INDUCCIÓN DE MICRONUCLEOS EN PACIENTES IRRADIADOS EN EXPLORACIONES DE RADIODIAGNÓSTICO MÉDICO	108
V.2.1. Muestra de sangre extraída antes de la exploración radiológica, (muestra control no irradiada).	109
V.2.2. Muestra de sangre no irradiada con contraste radiológico al 5%.	109
V.2.3 Muestra de sangre irradiada “in vitro” sin contraste	110
V.2.3.1 Determinación de la dosis de radiación	110
V.2.3.2 Frecuencia de micronucleos	110
V.2.4 Muestra de sangre extraída al finalizar la exploración radiológica, (muestra irradiada “in vivo”).	111
V.2.4.1 Determinación de la dosis de radiación	111
V.2.4.2 Frecuencia de micronucleos	111
V.3. INDUCCIÓN DE MICRONUCLEOS EN PACIENTES IRRADIADOS EN EXPLORACIONES DE MEDICINA NUCLEAR	111
V.3.1. Muestra de sangre extraída antes de la exploración gammagráfica, (muestra control no irradiada).	112
V.3.2. Muestra de sangre extraída al finalizar la exploración gammagráfica, (muestra irradiada).	113
V.4. INDUCCIÓN DE MICRONUCLEOS EN PACIENTES IRRADIADOS EN ACTIVIDADES TERAPÉUTICAS EN MEDICINA NUCLEAR	113
V.4.1. Muestra de sangre extraída antes del tratamiento ablativo, (muestra control no irradiada).	114
V.4.2. Muestra de sangre extraída en el momento del alta del paciente, (muestra irradiada).	114
V.5. ANALISIS ESTADISTICO	115
V.5.1. Pacientes irradiados en exploraciones de Radiodiagnóstico Médico	115
V.5.2. Pacientes irradiados en exploraciones de Medicina Nuclear	118
V.5.3. Pacientes irradiados en actividades terapéuticas en Medicina Nuclear	119

V.5.4. Dosis Equivalente Corporal Total (DECT).	119
V.6. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LOS MICRONÚCLEOS INDUCIDOS POR LA RADIACIÓN IONIZANTE	120
V.6.1. Tamaño del micronúcleo inducido por radiación	120
V.6.2. Relación entre el área del micronúcleo radioinducido y el área nuclear de linfocitos bloqueados con citochalasina B	120
V.6.3. Relación entre el área del micronúcleo radioinducido y el área de los linfocitos bloqueados con citochalasina B	120
V.6.4. Distribución del tamaño de los linfocitos bloqueados con citochalasina B	120
V.6.5. Tamaño y distribución del área nuclear de los linfocitos bloqueados con citochalasina B	121
<u>RESULTADOS MORFOLÓGICOS</u>	122
<u>CAPITULO VI. DISCUSIÓN</u>	136
<u>CAPITULO VII. CONCLUSIONES</u>	156
<u>CAPITULO VIII. RESUMEN</u>	158
<u>CAPITULO IX. TABLAS Y GRAFICAS</u>	160
<u>CAPITULO X. BIBLIOGRAFIA</u>	194
<u>CAPITULO XI. APENDICE</u>	218

CAPITULO I.-JUSTIFICACIÓN

I.JUSTIFICACIÓN

Hace años, el Área de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Murcia inició una línea de investigación sobre el efecto de la radiación ionizante sobre células en distintas situaciones de actividad funcional.

En este sentido, el Prof. Genovés había estudiado en 1975 el efecto de la radiación sobre la glándula tiroides humana en pacientes irradiados como consecuencia del tratamiento del cáncer de laringe. En 1986, el Prof. Alcaraz realizó su Tesis Doctoral sobre la respuesta a la radiación de la glándula tiroides de conejo sometida a diferentes estadios de actividad funcional poniendo de manifiesto un mayor efecto lesivo de la radiación en las glándulas tiroides hiperfuncionantes.

En 1990, el Dr. Belda analizó las alteraciones vasculares en dichas glándulas tiroides inducidas por la radiación con técnicas de microangiografía premortem; y en 1991, el Dr. Almagro puso de manifiesto en su memoria de Tesis Doctoral, las modificaciones de la actividad enzimática de la peroxidasa tiroidea provocada por bajas dosis de radiación ionizante, cuyas alteraciones eran más intensas en las glándulas tiroides hiperfuncionantes.

Con el paso del tiempo, se ha ido haciendo posible la detección de otros efectos radioinducidos en la células que permitieran establecer una relación directa con la dosis de radiación administrada. Durante decenas de años, todos los intentos habían quedado limitados a la dosimetría de aberraciones cromosómicas, la cual presenta claras limitaciones en las evaluaciones de dosis en exposiciones crónicas, y sobre todo una gran dificultad profesional y técnica para su utilización de rutina (LLOYD y PURROT, 1981). Aunque mejoró la sensibilidad del método con la introducción de técnicas de diferenciación de cromátides hermanas (LATT, 1973; PERRY y WOLF, 1978), estas son técnicas complicadas, aumentando el tiempo requerido para su estudio y elevando todavía más su coste.

En los últimos años, se ha intentado buscar un indicador biológico que fuera específico, sensible, de fácil manejo, y relativamente rápido y si fuera posible de bajo coste.

En este sentido, hace tres décadas que FLIEDNER (1964), describió la inducción de micronúcleos tras una exposición a neutrones y radiación gamma "in vivo". Desde entonces diferentes autores han descrito la aparición de micronúcleos en diversas situaciones normales y patológicas (IMRED y RADULESCU, 1981; NORMAN, 1984; GRILMAIER, 1984; WENZHENG Y TANAKA, 1984, BAN, 1993). Incluso en nuestro país, algunos autores han estudiado el efecto de los rayos X mediante diferentes indicadores biológicos, entre los que se encuentra alguna variante del test de micronúcleos (FERNANDEZ y cols.,1993).

En estos momentos, se ha intensificado el interés sobre el test de micronúcleos por parecer un indicador biológico de la radiación ionizante que puede presentar condiciones idóneas de un buen indicador en algunas situaciones de exposiciones accidentales.

En 1995, el Dr. Gómez analizó la inducción de micronúcleos en linfocitos humanos irradiados tanto “in vitro” como “in vivo” por rayos X y rayos gamma utilizando voluntarios como controles y algunos pacientes sometidos a exploraciones de Radiodiagnóstico.

Recientemente, la Dra. Rosa (2001) ha descrito un efecto antigenotóxico y antimutagénico de algunas sustancias antioxidantes frente al daño inducido “in vivo” e “in vitro” por rayos X y gamma.

El presente trabajo pretende valorar la utilidad del test de micronúcleos como indicador y dosímetro biológico de la exposiciones a radiación ionizante, con especial interés en las exposiciones provocadas en la práctica médica habitual del radiodiagnóstico médico y medicina nuclear. Todo ello con el deseo de que constituya la base de partida que permitiera la utilización de sustancias antioxidantes para minimizar un posible efecto lesivo inducido sobre estos pacientes por las exploraciones médicas que conllevan el empleo de la radiación ionizante.

CAPITULO II.- OBJETIVOS

II.OBJETIVOS

Durante los últimos años, diferentes estudios experimentales con exposiciones "in vitro", han sugerido que el test de los micronúcleos con Bloqueo Citocinético, podría utilizarse como un indicador biológico, incluso como un dosímetro biológico, para la estimación de las dosis de radiación ionizante dentro del campo de la Protección Radiológica, para los profesionalmente expuestos y para los pacientes sometidos a exploraciones radiológicas.

Este estudio ha pretendido elaborar un protocolo experimental para alcanzar, en este sentido, los siguientes objetivos:

1. Establecer una relación dosis-respuesta entre la dosis de radiación ionizante y el número de micronúcleos en linfocitos humanos de sangre periférica en exposiciones "in vitro" , para radiación gamma y rayos X.
2. Determinar un posible efecto genotóxico producido por diferentes tipos de radiaciones ionizantes utilizadas en la práctica médica, especialmente en procedimientos diagnósticos y terapéuticos de Medicina Nuclear y Radiodiagnóstico.

CAPITULO III.-INTRODUCCIÓN

III. INTRODUCCIÓN

III.1 Interés de la dosimetría biológica.

Uno de los logros más importantes de la Radiología ha sido el desarrollo y aplicación de diversas pruebas que indican una sobreexposición de personas a radiaciones ionizantes, bien a partir de fuentes naturales o de fuentes artificiales. Entre las exposiciones naturales tienen un interés especial aquellas que derivan del radón y de sus descendientes en lugares de trabajo y otros lugares internos.

La gran aplicación de las fuentes artificiales incluye el ciclo de energía nuclear y el manejo de los desechos radiactivos de la industria, medicina, agricultura, aplicaciones científicas, operaciones de limpieza, producción, pruebas y efectos ambientales de las armas nucleares. Todas estas áreas influyen en las categorías expuestas ocupacionalmente y en la población que vive a cierta distancia de dichas instalaciones.

Otro campo importante donde los indicadores biológicos y/o los ensayos dosimétricos son necesarios es en los accidentes radiológicos o nucleares que causan daños en las personas expuestas. La importancia de los métodos biológicos en la estimación de la dosis quedó demostrada en dos serios accidentes de radiación: Chernobyl y Goiania. En ambos casos, los métodos físicos fueron prácticamente inútiles para la dosimetría y la valoración del paciente o accidentado.

La información esencial para el médico procede de los datos biológicos. Además, el campo de aplicación de los indicadores biológicos es amplio y las condiciones de exposición son múltiples. Se ha descrito también que el número de candidatos para el control biológico es mucho mayor en la protección diaria de rutina de la radiación que en los implicados en sobreexposiciones accidentales; cientos de miles frente a unos pocos centenares.

En la presente revisión se discute el estado de los indicadores biológicos o dosímetros de valoración de dosis; para el futuro se tiende a llamar la atención de los biólogos sobre la radiación y su obligación de cuantificar varios fenómenos en torno a su conocimiento, por ejemplo, obtener relaciones de dosis-respuesta para obtener dosímetros nuevos, más precisos, más sensibles y más fiables.

III.2. NATURALEZA, NECESIDAD Y REQUERIMIENTOS DE LOS DOSÍMETROS BIOLÓGICOS

Los indicadores biológicos o dosímetros biológicos están basados en los distintos niveles de alteraciones inducidas por la radiación en la organización biológica, a nivel molecular, subcelular, celular o tisular, a nivel orgánico o de organismos.

Como no hay mecanismos de defensa incorporados contra todos los niveles de lesión, el balance entre la lesión y la respuesta biológica determinará la naturaleza y severidad del punto final detectable. Por tanto, la detección de los efectos deterministas alrededor del umbral de dosis y su severidad son el interés principal desde el punto de vista médico en las exposiciones accidentales y no sólo la valoración de la dosis. De acuerdo con esto, la asistencia médica de las personas sobreexpuestas requiere ensayos que indiquen la sensibilidad individual y la gravedad del daño dependiendo de las condiciones biológicas y patológicas.

La función de valoración de dosis de los indicadores o dosímetros biológicos es especialmente importante en las siguientes situaciones:

- Cuando los datos de las medidas físicas no están disponibles, si la persona lesionada no llevaba dosímetro personal.
- Cuando la dosis ha sido detectada y recogida por el dosímetro personal, pero su lectura no es fiable; por ejemplo, cuando debido a una exposición no uniforme del cuerpo el dosímetro quedó fuera del haz primario de radiación.
- Cuando el dosímetro físico ha sido irradiado, bien de forma premeditada o bien de forma accidental, sin que su dueño haya estado expuesto.

- Cuando los indicadores biológicos son necesarios para seguir las condiciones de los pacientes en terapia con radiación.
- Cuando se pretende comprobar la complicación del límite de dosis del sistema de protección radiológica para las categorías ocupacionales y de población (KOTELES, 1988).

Basados en las necesidades enumeradas anteriormente, los requerimientos generales para los indicadores o dosímetros biológicos son:

- Sensibilidad, para indicar sobreexposiciones procedentes de una irradiación aguda en el rango de dosis de una exposición ocupacional (>20-30 mSv) hasta sobreexposiciones accidentales de varios Grays.
- Proporcionalidad de sus cambios con la dosis absorbida por las células, tejidos y organismos.
- Especificidad, capacidad de reaccionar sólo con las radiaciones electromagnéticas o de partículas ionizantes; es decir, que otros factores físicos, químicos o biológicos no provoquen cambios en el indicador.
- Apariciones prematuras de cambios, entre horas o días, y gran duración de la señal después de la irradiación.
- Capacidad para detectar exposiciones parciales del cuerpo, preferentemente con localización exacta.
- El método debe ser aplicable a exposiciones fraccionadas y crónicas.
- Todos los tipos de radiación deben estar cubiertos por el método. En especial, deben ser medibles las exposiciones debidas a emisores internos.
- El material biológico que muestra el efecto debe ser accesible a la lectura sin métodos invasivos extensivos.

- La evaluación debe ser siempre fácil y rápida o transferible a máquinas o automatizable.
- Debe ser fácilmente realizable sin ninguna carga añadida al paciente.

Sin embargo, todavía no se ha desarrollado ningún ensayo que cumpla todos estos requisitos. Dependiendo del nivel actual de conocimiento científico en radiobiología siempre ha existido el esfuerzo de usar varios fenómenos biológicos como indicadores de radiación y esto es todavía un objetivo práctico importante en la biología de la radiación. No es sencillo encontrar un indicador que pueda enmarcar las diversas fases del complejo proceso inducido por la radiación. La solución del problema radica probablemente en varias observaciones, pruebas y evaluaciones complejas de varios signos biológicos y síntomas. Por tanto, los indicadores ya existentes y los que se desarrollarán constituirán un sistema para el análisis.

Estos objetivos se encuentran con múltiples dificultades que constituyen problemas que todavía no han sido solucionados:

- a) Cómo el conocimiento actual en la biología de la radiación, incluyendo sensibilidades individuales, factores extrínsecos e intrínsecos modificando la relación dosis-efecto, determina las posibilidades.
- b) La extrapolación de los datos experimentales con animales al organismo humano. Resulta prometedor, sin embargo, seguir como estrategia principal proyectar los efectos radiobiológicos conocidos actualmente en los requerimientos para los indicadores biológicos de radiación. De esta forma, pueden probarse los nuevos desarrollos de la radiobiología en aplicaciones de protección frente a la radiación.

III.2.1. ENSAYOS DISPONIBLES EN LA ACTUALIDAD Y DESARROLLOS FUTUROS

A continuación se presenta un sumario de las técnicas disponibles actualmente.

La Tabla I muestra los principales grupos de métodos existentes, aún cuando sería necesario su combinación ya que la mayoría de ellos dan una información limitada.

III.2.1.1. Observaciones Clínicas

Puede discutirse difícilmente la afirmación de que los signos clínicos, los síntomas y la condición en conjunto del paciente son muy importantes para el diagnóstico médico de la gravedad del síndrome de radiación. Los principales signos y manifestaciones, así como las enfermedades principales, están registrados en numerosos libros de texto. Siempre hay que tener en cuenta que la ausencia de síntomas no debe ser considerada como exposiciones insignificantes o nulas, a menos que se hayan confirmado con tests biológicos.

Otra nota práctica es que, como no hay síntomas que sean provocados exclusivamente por las radiaciones ionizantes, resulta de suma importancia para el diagnóstico diferencial tener en cuenta los datos de la anamnesis del paciente o trabajador irradiado.

III.2.1.2. Indicadores Hematológicos:

Durante varios años se han estudiado los cambios en el número de células sanguíneas como indicadores hematológicos en sangre periférica después de la irradiación. La fase temprana después del accidente de radiación está caracterizada normalmente por un pico inicial y temporal de granulocitos y por la primera caída del número de linfocitos. Estos signos pueden aparecer entre 0,5 y 1

Gy de radiación de baja LET. La mayor pendiente de caída del número de linfocitos y los valores por debajo del mínimo ocurren con una exposición más severa. El número de plaquetas también disminuye después de 1 Gy, pero este proceso es más prolongado que la disminución del número de linfocitos.

Estos sucesos solamente pueden seguirse obteniendo muestras de sangre frecuentes y la curva dosis-efecto muestra grandes diferencias individuales. Los datos hematológicos, sin embargo, permiten juzgar la reactividad del individuo tanto en la fase aguda como en la fase de regeneración. La principal ventaja del conteo de células sanguíneas es que da una impresión inmediata de la gravedad de un accidente, particularmente durante los dos primeros días, cuando no se pueden aplicar normalmente otras técnicas disponibles.

Debido a la radiosensibilidad relativamente alta de los linfocitos circulantes, después de grandes dosis desaparecen pronto de la circulación sanguínea tal y como ocurrió en varias víctimas del accidente de Chernobyl. Por tanto, se dio un nuevo enfoque para calcular la dosis, basado en la cinética de los granulocitos neutrófilos. La supresión aguda de la médula ósea podría ser cuantitativamente expresada por los parámetros temporales del conteo de los neutrófilos en sangre periférica, la también llamada curva de neutrófilos cruza el nivel de 500 neutrófilos/ μ l/ "día de 500" o "d500", e indica el comienzo, el grado y duración de pancitopenia, de modo que el "d500" es un parámetro hematológico cuantitativo de la gravedad del síndrome de médula ósea por radiación aguda (BARANOU y cols., 1995). También se ha encontrado que el "d500" tiene un grado particularmente alto de correlación con la producción dicéntrica en linfocitos (BARANOU y cols., 1995).

Basado en un gran número –aproximadamente 600- de personas lesionadas en 22 accidentes, se han desarrollado varios métodos para la evaluación hematológica del estado de la persona en el diagnóstico temprano por el conteo de linfocitos periféricos a las 24-48 horas del accidente, los granulocitos y las plaquetas desde el 4º día después de la exposición. Una simulación en ordenador de la granulocitopoyesis ha permitido el cálculo de las células que quedan intactas. Este último dato ayuda a planear la terapia y construir la prognosis como un “ensayo predictivo” para los siguientes 60 días. Los procedimientos y cálculos están basados en la “Hipótesis del Cuerpo Celular Lesionado” (SZEPESI y TLIEDNER, 1994).

III.2.1.3. Ensayos citogenéticos

III.2.1.3.1. Cromosomas de los linfocitos en metafase

El análisis de las deformaciones cromosómicas de los linfocitos en sangre periférica está ampliamente reconocido para medidas de las dosis de radiación. Es especialmente importante resaltar que en dosis equivalentes menores que 1 Sv, el análisis de la anomalía cromosómica puede ser solamente un posible indicador biológico de la exposición a radiación ionizante. Esto está influido por el nivel de aberraciones en la población (frecuencia basal espontánea) y por el número de células que son analizadas en cada caso.

Dependiendo de la experiencia del laboratorio, la dosis estimada suficientemente fiable puede estar por encima de 0,1-0,15 Gy, para radiaciones de baja LET o de 0,01 Gy para neutrones procedentes de fisión. Una de las más grandes desventajas de este test es que se necesita mucho tiempo debido a la necesidad del cultivo de las células y al conteo, requiriendo alrededor de tres días de

trabajo especializado para obtener el resultado de una sola persona (BENDER y cols., 1988).

En el desarrollo posterior del análisis de aberraciones cromosómicas, se han obtenido nuevos resultados espectaculares con la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). La técnica FISH ha llegado a ser una poderosa herramienta en la citogenética desde que fue introducida en 1969. Su gran potencial surge de su habilidad única para combinar información citológica sobre los cromosomas con la información molecular sobre la estructura y secuencia del ADN. La hibridación *in situ* permite la localización de una secuencia de ADN en particular cerca de los cromosomas en metafase. Si se tiñen solamente dos o tres cromosomas, puede encontrarse una relación lineal-cuadrática dosis-efecto para las aberraciones cromosómicas, tanto estables como por traslocaciones en linfocitos circulantes irradiados "*in vitro*" con rayos γ .

La principal ventaja de esta nueva técnica de tinción es que las aberraciones estables pueden ser detectadas mucho después de la irradiación. El rendimiento después de una dosis dada se ha estimado entre 1,5-2 veces mayor de aberraciones dicéntricas. Ciertas limitaciones de la aplicación pueden ser que el valor base de la población es aproximadamente un orden de magnitud mayor que para las aberraciones dicéntricas. La técnica es muy prometedora, aunque tienen que clarificarse varios aspectos en el futuro, como la nomenclatura de las aberraciones simples y complejas observadas, las relaciones dosis-efecto, así como su uso que está limitado principalmente a dosis absorbidas por debajo de 2 Gy. Las investigaciones actualmente solo incluyen unos pocos cromosomas (LUCAS y cols., 1992; STRAUME y cols., 1992).

Han sido notorias las buenas correlaciones encontradas entre la traslocación y las anomalías dicéntricas que se producen en la población de supervivientes de bomba-A.

III.2.1.3.2. Técnica de Micronúcleos:

En los últimos años se han ido acumulando un gran número de referencias que indican el recuento de micronúcleos en linfocitos humanos como una fuente de información de los daños citogenéticos derivados de radiaciones ionizantes así como de tóxicos químicos.

Las relaciones dosis-efecto establecidas tienen un ajuste lineal o cuadrático en un rango de dosis de 0,1 y 4 Gy (KORMOS y KOTELES, 1988). También se han acumulado los datos de los valores base de la población (frecuencia basal espontánea), como consecuencia, las dosis estimadas pueden ser más fiables. Las aproximaciones se realizaron también para determinar los valores base individuales de categorías de alto riesgo de trabajadores nucleares para asegurar una estimación más precisa de la dosis en caso de una sobreexposición.

La realización relativamente simple del test puede ayudar en la experimentación de efectos combinados y sirve de ayuda para estimar la radiosensibilidad individual. Las posibilidades de evaluar la frecuencia a través de análisis de imagen automatizados y computerizados proporcionarían a esta técnica un mayor rango de aplicación que todavía en estos momentos no tiene (FENECH y MORLEY 1985, 1986; ALMASSY y cols., 1987; HALL y WELLS, 1988).

III. 2.1.3.3. Condensación prematura de cromosomas

Linfocitos aislados a partir de sangre periférica se fusionan con células mitóticas de ovario de hámster usando polietilenglicol (PEG). El daño en sus cromosomas condensados prematuramente aparece como un sensor indicador de la exposición. Los efectos de la radiación se manifiestan como fragmentos, es decir, material cromático que excede a las 46 cromátidas de los cromosomas; estos fragmentos son contados y se usan para estimar el daño citogenético.

La condensación prematura de los cromosomas puede ser utilizada como un biosímetro en linfocitos humanos no estimulados, evitando de esta forma complicaciones derivadas de retrasos en el ciclo celular y células muertas en interfase a altas dosis. La técnica es más eficiente para detectar la proporción de células no dañadas. Su resolución es mayor que la de otras técnicas citogenéticas. Como consecuencia, el daño inicial puede ser determinado inmediatamente después de la exposición. La relación dosis-efecto que puede encontrarse es lineal (GREINERT y cols., 1985; BLAKELY y cols., 1995).

Un paso adicional fue introducido con la coloración de los cromosomas en la combinación de la técnica FISH con la de PCC. La curva dosis-respuesta para la inducción de fragmentos fue lineal dentro del par de horas siguientes a la exposición. Luego, llegó a ser lineal y cuadrática. El método indica que la coloración de los cromosomas condensados prematuramente puede ser utilizable para la dosimetría biológica.

III. 2.1.3.4. Intercambio de cromátidas hermanas (SCE)

Este ensayo no está considerado como una posibilidad práctica para indicar los daños de la radiación. Recientemente se han publicado datos sobre

frecuencias aumentadas en los trabajadores de Chernobyl y en cierta población expuesta al radón (PRABHAVATHI y cols., 1995; LAZUTKA, 1995).

III. 2.1.4. Indicadores Bioquímicos

Se han hecho considerables esfuerzos en las últimas tres décadas para encontrar indicadores bioquímicos del daño producido por la radiación (como metabolitos o actividades enzimáticas) que supuestamente aparecerían o cambiarían sus actividades en los fluidos corporales como la orina o la sangre, debido a procesos celulares degradativos inducidos por la radiación.

Algunos de estos han sido deoxicitidina, timidina, pseudouridina, el ácido beta-aminoisobutírico, productos de degradación de los ácidos nucleicos, aminoácidos como la cisteína, taurina y creatina, como productos del metabolismo proteico o de la degradación. Algunos autores coinciden en que estos parámetros dependen de una serie de condiciones fisiológicas o patológicas, de los individuos (edad, sexo, raza, desórdenes metabólicos, que dificultan su uso).

El optimismo basado en los resultados obtenidos para los animales de experimentación en varias pruebas, no puede ser justificado cuando son probados en sujetos humanos. Los metabolitos de las aminas biogénicas, como el ácido 5-hidroxiindólico, dan normalmente una dosis-respuesta a más altas dosis, mientras que otros indicadores pueden ser usados de forma más precisa (LOLTMAN y cols., 1995).

Entre los indicadores bioquímicos se han mencionado también cambios en la actividad de ciertos enzimas. Se han hecho pruebas con varios enzimas que normalmente aparecen en el suero sanguíneo después de serias lesiones en varios

tejidos como el músculo, hígado, piel, glándulas salivales etc., así como la glutamato oxalacético transaminasa (GOT), la creatinfosfoquinasa (CPK) o la amilasa. Los datos procedentes de experimentos con animales y, ocasionalmente, de experiencias humanas muestran que la mayoría de estos test no cumplen los requerimientos de indicadores biológicos en caso de accidente.

III. 2.1.5. Resonancia del spin electrónico:

Entre los indicadores a nivel molecular, hay que mencionar la determinación de la resonancia del spin electrónico de los radicales libres inducidos por la radiación, conservados en tejidos de bajo contenido en agua como el esmalte de los dientes, las uñas o el pelo. La relación lineal dosis-respuesta se encontró entre 0,5 y varias decenas de Gy. La técnica se ha usado en los supervivientes de la bomba-A así como en las víctimas de Chernobyl. Anteriormente pudo ser ampliamente utilizada, sin embargo, varios puntos de la técnica han sido declarados dependientes de la calidad de la radiación, efectos de la tasa de dosis, temperatura o naturaleza de la muestra biológica que se ha usado (KUDYNSKY y cols., 1994).

III. 2.1.6. Indicadores en exposiciones internas

Aunque el interés principal de la dosimetría biológica radica en la aplicación de técnicas adecuadas para estimar las dosis absorbidas en casos de serias sobreexposiciones, principalmente de radiaciones externas, los problemas de las exposiciones internas también tienen que tenerse en cuenta. Actualmente hay dos condiciones de especial interés, las exposiciones al radón y a sus descendientes y los radioyodos.

Ya que las exposiciones al radón son preocupantes, se han hecho algunos acercamientos tanto en los mineros como en la población que vive bajo exposiciones aumentadas. Se han encontrado frecuencias aumentadas de

parámetros citogenéticos, pero todavía no se han obtenido las curvas dosis-efecto. Una situación similar existe para las exposiciones de plutonio.

La estimación de la dosis después de la terapia con radioyodo se encontró que era dependiente de la condición fisiológica y patológica del tiroides así como de la cantidad de radioisótopo concentrado en la glándula. En la enfermedad de Graves-Basedow la frecuencia de micronúcleos aumentó pero en los adenomas tóxicos no se ha encontrado un aumento a pesar de las altas dosis aplicadas (KOTELES, 1993).

III. 2.1.7. Indicadores para daños locales

Para zonas del cuerpo específicas o daños locales, aunque ocurren más frecuentemente, el arsenal de diagnóstico es más modesto. Todavía no se han encontrado indicadores dosis-dependientes para la piel humana que puedan ser usados de forma rutinaria.

Junto a las observaciones clínicas, aparecen en la mayoría de los casos procedentes de un eritema temprano y descamaciones secas y húmedas, daños vasculares hasta necrosis dérmicas y subcutáneas extensivas, que se han usado como elementos cutáneos para indicar la localización, extensión y gravedad del daño. Los métodos deben ser también de valor diagnóstico y aconsejar la necesidad y condiciones de la terapia utilizada así como diferenciar entre regiones cutáneas dañadas y no dañadas para estimar los trasplantes de piel.

El método incluye el análisis de la capa basal de células, folículos pilosos y estructura del pelo así como la atrofia dérmica usando ultrasonidos para medir el grosor de la piel, la permeabilidad vascular, capilaroscopia y termografía.

La muerte celular dosis-dependiente en los folículos pilosos da como resultado el adelgazamiento del pelo. Se puede medir el porcentaje de pelo displásico, el número de aberraciones cromosómicas del epitelio del pelo arraigado, el número de células muertas (por apoptosis) en los folículos del pelo y el número de núcleos celulares en la médula del pelo.

Los pelos se pueden obtener fácilmente de la mayoría de las partes del cuerpo. De esta forma, se pueden detectar exposiciones parciales del cuerpo, y cada vez es más importante la localización de la exposición de la forma más exacta posible. Parece posible realizar un análisis automático del diámetro del pelo (HAMILTON y POTTEN 1995).

El sistema indicador más sensible (muerte de las células en el folículo piloso, 0,05-1 Gy), solamente puede hacerse por métodos invasivos y su aplicación está limitada en el tiempo (solamente en exposiciones cortas). El sistema que tiene más fácil accesibilidad (anchura del pelo, pelo displásico), es menos sensible (1-10 Gy y 2-10 Gy, respectivamente) y el efecto necesita un mínimo de 2-3 días para la expresión, el tiempo óptimo de determinación está entre 7 y 14 días. Hasta ahora la experiencia en humanos es limitada. Debería investigarse mucho más sobre la variabilidad entre diversas partes del cuerpo y entre los distintos individuos.

Hay dos procedimientos de diagnóstico instrumental que deben usarse en casos de sobreexposiciones locales para determinar la severidad, es decir, los métodos termales y los radioisótopos. Los dos son más fiables cuando es posible comparar el área irradiada con la correspondiente no irradiada.

Varias formas de termografía pueden usarse con dos propósitos, primero, ver si hubo algún daño, segundo, ver la extensión del daño. Tanto la

termografía de contacto como la teletermogrametría infrarroja son igualmente buenas y útiles –quizá la última es mejor aunque más cara- para el diagnóstico de la irradiación parcial del cuerpo, principalmente de las extremidades (KOTELES y cols., 1987; KOTELES y BENKO 1994).

El método radioisotópico registra la circulación vascular en las regiones cuando se inyecta ^{99m}Tc -pertecnecinato por vía intravenosa y la distribución se detecta por cámara de centelleo.

Estos dos métodos deben ser complementarios. No permiten determinar la dosis exacta pero ayudan en la valoración de la severidad clínica del daño. La termografía es una técnica sensible y usual para detectar daños locales de radiación y para determinar sus extensiones en las fases donde los síntomas clínicos no son evidentes, es decir, en los períodos más próximos y latentes.

III.2.2. TENDENCIAS FUTURAS EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO:

III.2.2.1. Mutaciones genéticas:

Se han desarrollado ensayos que miden las frecuencias de eritrocitos que han perdido el gen de expresión en el *locus* de Glicoforina A (ensayos GPA). Esto se ha aplicado en los supervivientes de la Bomba-A, y para unas pocas personas expuestas en el accidente de Chernobyl. Por supuesto, el desarrollo sofisticado en la distribución de células y en la preparación de anticuerpos monoclonales por inmunomarcaje han hecho factible esta aproximación.

La frecuencia de células mutantes en los supervivientes de la bomba A se ha correlacionado con la dosis estimada mayoritariamente para grupos de población y con más dificultad para individuos. Se han encontrado respuestas similares en los eritrocitos de la población relacionada con Chernobyl. Se ha notado que los mutantes existieron durante años después de la exposición.

El ensayo del gen del receptor de las células T (TCR) en linfocitos de sangre periférica pareció ser aplicable después de la exposición a la radiación y demostró que la frecuencia de células mutantes era considerablemente elevada.

El ensayo de la hypoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HPRT) indicó un incremento significativo en la frecuencia de células mutantes de manera dosis-dependiente, pero la pendiente fue más bien poco indicadora de la retención *in vivo* entre los supervivientes de la bomba-A. El test HPRT fue aplicado con éxito en las personas expuestas durante la contaminación ambiental en Goiania (Brasil) y se encontraron aumentos de las frecuencias de mutación durante años en las personas expuestas a entre 1 y 7 Gy. En casos de pequeñas sobreexposiciones ocupacionales el ensayo HPRT no ha sido informativo.

III.2.2.2. Fenómenos celulares

También se han probado alteraciones en la superficie celular como indicadores biológicos de los daños de la radiación. Se han realizado algunos trabajos para relacionar la dosis de radiación a movilidades electroforéticas de varias células incluyendo eritrocitos y linfocitos. Debido a alteraciones en la membrana celular inducidas por la radiación, se han desarrollado también pruebas de unión a la lectina. Aunque éste último proporcionó más sensibilidad que el anterior, en general, los indicadores basados en la membrana no tienen prácticamente importancia y persisten solamente por un tiempo relativamente corto.

El ensayo de células con electroforesis en gel (“Cometa”) es un método sensible para la detección de roturas en la cadena simple de DNA en células individuales. Además debería llegar a ser una técnica habitual en la detección de dosis relativamente bajas. La contribución de este ensayo con otros citogenéticos similares lleva a evitar subestimaciones del daño indicando tanto daños ligeros como serios en células individuales. Es obvio que el primer paso debe ser la realización de curvas dosis-respuesta (SINGH y cols., 1995; PLAPPERT y cols., 1995).

Entre las posibilidades futuras están análisis citológicos tales como los núcleos teñidos con fluorescencia. La localización de células con morfología aberrante, fragmentación, multilobulación o apoptosis podrían suponer un gran avance como bioindicadores muy útiles del daño producido por la radiación (GREENSTOCK y MAVES, 1995).

El indicador espermatogénico es un caso especial para daños locales o regionales cuando las gónadas masculinas están situadas dentro del campo de radiación.

Se han descrito cambios en la cantidad, movilidad y morfología de los espermatozoides tras la exposición a la radiación ionizante. Debido al tiempo de maduración del esperma adulto, la disminución de la cantidad de esperma puede no observarse hasta aproximadamente 45 días después de la exposición corporal a la radiación.

El método tiene un gran número de inconvenientes, de manera que es bastante improbable que ocupe un papel importante en la dosimetría biológica.

Puede usarse solamente con una parte de los machos de la población y solamente con aquellos machos cuya espermatogénesis está intacta. Por otra parte, el método es invasivo y los datos son limitados para el ratón, por tanto, no hay mucha información disponible en el hombre.

III.2.2.3 Indicadores Inmunológicos

El sistema inmune tiene una gran radiosensibilidad, por tanto resultó muy útil para investigar técnicas de dosimetría biológica. Se han evaluado algunas de estas técnicas, sin embargo, actualmente no existe un único indicador disponible para su uso rutinario en los ensayos previos de exposición a la radiación. Esto es debido, en parte, a la complejidad del sistema inmune y al hecho de que la información acerca de los factores celulares y solubles implicados en el mecanismo de defensa inmune esta en constante desarrollo (TUSCHL y cols., 1995).

Los indicadores inmunológicos potencialmente útiles se pueden agrupar según el aspecto en el que están basados en: 1) enumeración del conjunto de linfocitos; 2) valoración de la función que requiere la interacción de diferentes subpoblaciones de células blancas sanguíneas; 3) producción de anticuerpos; y 4) respuestas mediadas por células como los test de hipersensibilidad cutánea y capacidad para rechazar tejidos extraños u órganos transplantados.

A pesar de décadas de largas investigaciones y adelantos ingeniosos, se han desarrollado solamente unos pocos indicadores y aún menos dosímetros biológicos, que sean realmente aplicables. Algunos otros, sin embargo, son bastante prometedores. Entre los más útiles y más ampliamente aceptados se encuentran los ensayos citogenéticos y la mayoría de ellos son de uso obligatorio en accidentes

radiológicos. Sin embargo, también tienen sus limitaciones, especialmente cuando ha sido valorada la dosis de irradiación parcial del cuerpo. Estos son los que utilizaremos en este estudio.

TABLA I

**PRINCIPALES GRUPOS DE INDICADORES BIOLÓGICOS Y DOSÍMETROS
DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR LA RADIACIÓN**

GRUPO	INDICADOR	DOSÍMETRO
HEMATOLÓGICOS		
-Disminución de células periféricas (linfocitos, granulocitos, plaquetas y eritrocitos)	+	-
-Disminución de células de médula ósea	+	-
CITOGENÉTICOS		
-Aberraciones cromosómicas en metafase (dicéntricas, anillos)	+	+
-Aberraciones numéricas	+	-
-Aberraciones en interfase, micronúcleos	+	+
Condensación prematura de cromosomas	+	+
Intercambio de cromátidas hermanas	+	-
Hibridación in situ con fluoresceína (FISH)	+	+
CITOLÓGICOS-MOLECULARES		
-Rotura de ADN por electroforesis en gel "cometa"	+	+
-Fenómenos de membrana		
Electroforesis de células	+	-
Alteraciones de unión (lectina etc)	+	+

Efecto genotóxico de la radiación ionizante en procedimientos médicos

-Pérdida en eritrocitos del gen de expresión en el locus de Glicoforina A	+	-
-Funciones celulares	+	-
-Morfología celular	+	-
-Densidad celular	+	-
-Capacidad reproductiva	+	-

ESPERMATOGENICOS

-Cantidad de esperma		
movilidad	+	-
morfología	+	-

INMUNOLÓGICOS

-Cambio en el recuento de los tipos de linfocitos	+	-
-Cambio en las funciones celulares	+	-
-Producción de anticuerpos	+	-
-Respuesta mediada por células en los test de hipersensibilidad cutánea	+	-

RESONANCIA DEL SPIN-ELECTRONICO

pelo, dientes, uñas	+	-
---------------------	---	---

BIOQUIMICOS

-Productos metabólicos	+	-
-Actividades enzimáticas	+	-
-Capacidad reparativa	+	-

III.3. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

Los micronúcleos son cuerpos pequeños y redondos que se encuentran inmersos en el citoplasma celular y visiblemente separados del núcleo principal, pero al que se parecen en forma, estructura y características de coloración (ALMASSY y cols., 1987).

Las primeras observaciones de cuerpos intracitoplasmáticos de material nuclear atribuidos a daño cromosómico inducido por la radiación, se describieron hace varias décadas en esperma de ratón y en células meristemáticas de la raíz de algunas plantas (THODAY, 1951). Posteriormente los micronúcleos se han descrito en hematología como cuerpos de Howell-Jolly, es decir, gránulos esféricos que se observan en el interior de los eritrocitos policromáticos y que se consideraron de origen nuclear, asociados al daño cromosómico.

Los micronúcleos pueden originarse de fragmentos acéntricos que no pueden incorporarse a los núcleos hijos durante la división celular por carecer de centrómero (SASAKI y NORMAN, 1966; HEDDLE y CARRANO, 1977); también pueden estar formados por cromosomas completos que quedan fuera del núcleo durante la mitosis por un fallo en el eje mitótico o por configuraciones complejas de cromosomas que causan problemas durante la anafase (SCHMID, 1975, 1976).

Hoy, se considera que la producción o la formación de micronúcleos puede inducirse por agentes clastogénicos o inhibidores mitóticos. El tamaño del micronúcleo se ha utilizado para conocer su origen; como se esperaba, la mayoría de micronúcleos inducidos por agentes clastogénicos son generalmente más pequeños que aquellos inducidos por tóxicos del eje mitótico (YAMAMOTO y KIKUCHI, 1980; VALADAUD-BARRIEU, 1983). PINCU y cols., (1984) estimaron que el 80% de

micronúcleos en linfocitos irradiados con radiación gamma tienen un contenido de ADN menor del 6% del contenido del núcleo en la interfase, lo que implicaría, para algunos autores, un origen de fragmentos acéntricos. Los restantes micronúcleos con un contenido de ADN entre el 6-20% del contenido en el núcleo principal, se supone que se han originado principalmente como resultado de defectos en el eje mitótico. La mayoría de los micronúcleos pueden sintetizar ADN durante la fase S (NUSSE y KRAMER, 1984; PINCU y cols., 1985) y algunos de ellos lo pueden hacer incluso cuando el núcleo principal no está en la fase S (OBE y cols., 1975; PINCU y cols., 1984).

El tamaño de los micronúcleos inducidos por radiación ionizante cae prevalentemente dentro de la categoría más pequeña (6-12 μm^2), aunque los extremos más altos y más bajos pueden también encontrarse (HOGSTEDT y KARLSSON, 1985).

Debido a su origen, el número de micronúcleos es dependiente de la proliferación celular. La primera aparición de los micronúcleos está al final de la primera división mitótica tras la exposición a radiación o tratamiento, pero el mayor número de micronúcleos puede aparecer en las siguientes divisiones y acumularse en el citoplasma celular durante un cierto periodo de tiempo. Posteriormente, se observa un descenso rápido de la frecuencia de micronúcleos, principalmente debido a la pérdida de células aberrantes así como a la dilución de las células micronucleadas con las células normales.

La producción radioinducida de micronúcleos la describió por primera vez EVANS y cols. (1959) en células de raíz de habas irradiadas con radiación gamma y neutrones rápidos. Sin embargo, la utilidad de los micronúcleos para comprobar el efecto mutágeno de algunas sustancias la propuso SCHROEDER

(1970) mucho más tarde mediante el recuento de anomalías nucleares en la médula ósea de roedores para detectar el daño inducido "in vivo" (test de anomalía nuclear).

Posteriormente se ha desarrollado el test de micronúcleos para frotis de médula ósea (SCHMID y cols., 1971; LEDEBUR y SCHMID, 1973; HEDDLE, 1973). Desde entonces, este experimento se ha utilizado en ensayos "in vivo" de gran variedad de agentes para conocer su capacidad mutágena. La técnica se basa en el recuento de micronúcleos de un tipo de células de la médula ósea, el eritrocito policromático: eritrocito joven en médula ósea, que ha expulsado el núcleo principal sin llegar a expulsar los restos nucleares o micronúcleos (SCHMID, 1975). Este método se extendió posteriormente a los eritrocitos policromáticos que circulan en sangre periférica, resultando ser tan sensible como el realizado en médula ósea, y mostrando tener ciertas ventajas tales como mayor simplicidad y posibilidad de repetición al no precisar el sacrificio de los animales para su realización (MacGREGOR y cols., 1980).

COUNTRYMAN y HEDDLE en 1976 describieron el método de detección de micronúcleos en linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica que rápidamente se aplicó en estudios "in vitro" e "in vivo" de poblaciones humanas sometidas a agentes peligrosos, tóxicos o mutágenos.

Desde entonces el test de los micronúcleos, con múltiples variantes, se ha utilizado con éxito en gran variedad de células en cultivo como por ejemplo en células exfoliadas de mucosa bucal para estudios humanos de exposiciones "in vivo" a agentes asociados con la inducción de cáncer en cavidad oral (STICH y cols., 1982, 1983).

Otro test útil de micronúcleos fue desarrollado para estudios animales de células epiteliales del colon, como células diana para cánceres intestinales

(HEDDLE y cols., 1982). En otra modificación de la prueba, llamada ensayo del micronúcleo transplacentario, la detección de micronúcleos se realiza simultáneamente en eritrocitos policromáticos :

- En células epiteliales del cólon para estudios del cáncer intestinal en animales (HEDDLE y cols., 1982).
- En eritrocitos policromáticos de médula ósea de hembra embarazada, y en muestras de hígado y sangre de su embrión; permitiendo una estimación cualitativa de los riesgos de madre y feto a exposiciones de agentes genotóxicos, entre los que se han llegado a considerar también las radiaciones ionizantes (COLE y cols., 1979;1981).
- En esperma de rata (LAHDETIE y PARVINEN, 1981), y se han realizado pruebas para desarrollar el método de los micronúcleos en semen humano (LAHDETIE, 1985; LIMING, 1985).
- En Botánica, la prueba de micronúcleos-tradescantia (trad-MCN); desarrollada por MA (1979;1981) y basado en el recuento de micronúcleos en tetradas de células madre de polen, ha encontrado una aplicación amplia en estudios de genotoxicidad por contaminantes ambientales (MA y cols., 1984).

Sin embargo, la técnica de micronúcleos más frecuentemente descrita durante los últimos años sobre células humanas es la técnica en linfocitos de sangre periférica; incluso, se han ido realizando importantes modificaciones que, en poco tiempo, han conseguido mejorar la sensibilidad del test.

Cronologicamente se han desarrollado técnicas con citoplasma destruído (HUBER y cols., 1983; HOGSTEDT, 1984), con citoplasma conservado (ALMASSY y cols., 1987), de estimulación con Bromoioudiridina (PINCU y cols., 1984) y posteriormente con citochalasina B (bloqueo citogenético), en donde se estudian los micronúcleos que aparecen sólo tras la primera división celular (FENECH y MORLEY, 1985; HUBER y cols., 1983), habiéndose utilizado todos para determinar y cuantificar el efecto tóxico de diferentes agentes químicos y físicos sobre el material genético (FLIYD Y CASSONI, 1994).

III.3.1. Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón

El test de micronúcleos en médula ósea “in vivo” es un método ideado originariamente como test de chequeo para comprobar los efectos de determinados fármacos sobre el material genético. Las sustancias sometidas a estudio en este test se administran a pequeños mamíferos (ratones y ratas), y el efecto es observado directamente en las extensiones microscópicas de su médula ósea (SCHMID, 1974).

El test de micronúcleos en médula ósea de ratón está basado en la observación de los cambios que sufren los cromosomas de las células de la médula ósea cuando entran en mitosis. Así, después de la telofase, una considerable proporción de cada cromátida desplazada, no es incluida en el núcleo de las células hijas y forma únicos o múltiples micronúcleos en el citoplasma de esas células. Se denominan micronúcleos por su reducido tamaño en comparación con el presentado por el núcleo real de la célula.

Los micronúcleos pueden observarse en diferentes células de la médula ósea de los animales tratados con agentes mutágenos o genotóxicos, de modo que los podemos encontrar en mieloblastos, mielocitos y eritroblastos entre otros.

En los primeros trabajos, los micronúcleos se estudiaron tanto en la serie blanca como en eritrocitos, tanto normocromatófilos como policromatófilos (BOLLER y SCHMID,1970 y SENSSEN,1974). Hoy día, el test de los MN sobre eritrocitos policromatófilos de médula ósea de ratón, originalmente diseñado y desarrollado por SCHMID (1975), es probablemente el test de genotoxicidad más utilizado "in vivo" (MAZUR,1995).

El análisis de micronúcleos de médula ósea sobre eritrocitos es un procedimiento rápido y sencillo para la detección del daño cromosómico "in vivo" producido por agentes químicos y físicos (HEDDLE y SALOMONE, 1981; ALMASSI y cols., 1987; MAVOURNIN y Cols., 1990 y KRISHNA y cols., 1992; MAZUR, 1995), desplazando al resto de tipos celulares fundamentalmente porque:

Recientemente, ha aparecido una modificación de la técnica de SCHMID (1973), y que se encuentra en fase de aceptación dentro de los estudios toxicológicos.

Este nuevo procedimiento para la obtención de las preparaciones microscópicas y la observación de los micronúcleos, consiste en la utilización de las técnicas de tinción e Acridina-naranja para el análisis de reticulocitos en sangre periférica de pequeños mamíferos (LENARCZYK y SEOWIKOWSKA,1995; MAZUR,1995). Esta técnica desarrollada por HAYASHI y cols. (1990) tuvo su validación en el Quinto Grupo de Estudio para el test de los Micronúcleos de la Sociedad de Estudio de las Mutaciones de Japón. Entre los agentes estudiados por

este nuevo procedimiento también se incluyen las radiaciones ionizantes (LENARCZYK y SCOWIKOWSKA, 1995).

Este nuevo procedimiento para el estudio de la frecuencia de micronúcleos en los reticulocitos de sangre periférica de ratón, se ha comenzado a utilizar para la medida cuantitativa de las aberraciones cromosómicas inducidas por diferentes agentes genotóxicos, entre los que se encuentra la radiación ionizante (MAZUR,1995; HAYASHI y cols.,1994; GRAWE y cols.,1993; MORALES-RAMIREZ y cols.,1994; LENARCZYK y SCOWIKOWSKA,1995).

Aún cuando esta técnica permite la obtención repetida de muestras sanguíneas de un mismo animal a o largo del tiempo, la tinción sólo permanece 24 horas, por lo que el recuento celular de cada preparación ha de ser realizado rápidamente, permitiéndose la posibilidad de revisar la información obtenida (HAYASHI y cols.,1990).

Recientemente se ha descrito un nuevo procedimiento de tinción utilizando conjuntamente azul de metileno y naranja de acridina permitiendo la posibilidad de un alargamiento en el tiempo de almacenamiento de hasta 95 días y poder revisar la información obtenida (SUGIHARA Y cols., 2000).

III.3.2. Ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre humana:

Para tratar de solventar los problemas que presentaba el test en médula ósea, el test se extendió a sangre periférica, ya que presentaba ciertas ventajas como una mayor simplicidad y la posibilidad de repetición con las mínimas molestias.

Primero se realizó sobre eritrocitos policromáticos y posteriormente en linfocitos humanos de sangre periférica (COUNTRYMAN y HEDDLE, 1976), que rápidamente se aplicó en estudios tanto "in vivo" como "in vitro" para agentes tóxicos o mutágenos.

Este test presenta las ventajas de su fácil obtención y posibilidad de hacerlo repetidamente, su fácil transporte y almacenamiento. Así mismo, los linfocitos de sangre periférica son fácilmente estimulados a dividirse y ello permite una determinación de los efectos de exposiciones ionizantes parciales.

III.3.2.1. Preparación del cultivo de linfocitos con citoplasma destruido

COUNTRYMAN y HEDDLE (1976) y COUNTRYMAN y cols. (1977), describieron por primera vez un método para la demostración de micronúcleos inducidos por radiación en preparaciones de cultivos de linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica. Debido al tratamiento hipotónico al que se sometían las células, esta técnica producía principalmente núcleos linfoblásticos sin citoplasma reconocible. Por ello, los micronúcleos estaban más o menos separados de estos núcleos. Para establecer la asociación entre los micronúcleos y los núcleos principales, se adoptaron criterios auxiliares como el de que los micronúcleos deberían estar situados a una distancia máxima de tres o cuatro veces el tamaño del diámetro nuclear.

Se observó que la frecuencia de micronúcleos aumentaba conforme se elevaba el tiempo de cultivo, obteniéndose el máximo recuento de micronúcleos a las 84 ó 96 horas del comienzo del mismo (COUNTRYMAN y HEDDLE, 1976). La primera curva dosis-respuesta publicada para micronúcleos inducidos por rayos X,

con exposiciones entre 50-400 R, se estableció según el modelo tradicional exponencial de $Y = K \cdot D^n$, con un exponente de dosis de $n = 1.2$ (Y = frecuencia de micronúcleos, D = dosis de radiación en R, y K = constante). Estos resultados contrastan con los valores de exponente de dosis de 1.8-2.0 obtenidos en curvas dosis-respuesta para aberraciones cromosómicas inducidas por radiaciones con baja LET analizadas en metafase (EVANS y O'RIORDAN, 1975). Las diferencias se atribuyeron a los retrasos en la división celular y a la muerte celular aumentada por las dosis de radiación más elevadas en el estudio de los micronúcleos.

Una influencia similar, en la proliferación celular, se evidenció en un estudio posterior con radiación gamma (Cs-137), utilizando dosis entre 10-400 cGy (KREPINSKY y HEDDLE, 1983). Se observó un escaso incremento en la frecuencia del número de micronúcleos, entre 300 y 400 cGy. Para dosis entre 10 y 300 cGy, la curva dosis-respuesta, respondía a un modelo lineal cuadrático. Los autores, teniendo en cuenta la aplicación del experimento de micronúcleos para estimar la exposición de radiación individual, sugirieron que las dosis inferiores a 25 cGy no podían detectarse con fiabilidad. Una comparación entre el análisis de cromosomas y el recuento de micronúcleos, en muestras de sangre de 4 trabajadores expuestos a radiación mixta de tritio (H-3) y gamma, reveló una pobre capacidad de resolución del ensayo de micronúcleos para exposiciones a bajas dosis.

El fraccionamiento de la dosis en dos exposiciones de 200 R (COUNTRYMAN y HEDDLE, 1976), reveló un típico efecto de fraccionamiento de dosis. La frecuencia de micronúcleos quedó reducida por un factor de 2, aproximadamente.

También se puso de manifiesto que el ensayo de micronúcleos era un medio adecuado para detectar el aumento de sensibilidad de los linfocitos a dosis de 50-400 R de rayos X en el síndrome de Down (COUNTRYMAN y HEDDLE, 1976; COUNTRYMAN y cols., 1977) y a la mitomicina C en la anemia de Fanconi y

radiación gamma en células linfoblásticas de la ataxia telangiectasia (HEDDLE y cols., 1978).

NORMAN y cols. (1978), aplicaron el ensayo de micronúcleos, para comprobar el efecto de elementos químicos sobre los linfocitos humanos. Observaron frecuencias crecientes en el número de micronúcleos en muestras de sangre de 9 pacientes tratados con diatrizoato (medio de contraste utilizado en angiografía).

Posteriormente, NORMAN y cols. (1984), realizaron un estudio en 73 adultos entre 18 y 47 años, observando una frecuencia creciente del número de micronúcleos en relación directa con la edad del paciente. El sexo y el examen médico con rayos X a bajas dosis, dos años antes de la toma de muestras de sangre, no revelaron resultados significativos. Por otro lado, sí reveló un pequeño incremento estadísticamente significativo en el número de micronúcleos en los pacientes que fueron sometidos a un examen de rayos X, en el que se había utilizado medio de contraste.

NORMAN y cols. (1985), evaluaron si el ensayo de micronúcleos podría utilizarse para la identificación del daño cromosómico en la población humana. Las aberraciones cromosómicas y el número de micronúcleos fueron analizados en distintos grupos de personas sometidas a radiaciones ionizantes, a agentes clastogénicos y/o a irradiaciones terapéuticas. Se comprobó que las personas con alta frecuencia de aberraciones cromosómicas (1 o más células con aberraciones por 100-200 metafases) también podían ser identificadas por medio del recuento de micronúcleos. En este estudio, también, la edad presentaba una relación directa significativa con el número de MN.

III.3.2.2. Preparación del cultivo linfocito con citoplasma preservado

Con el método tradicional de preparación del linfocito, el citoplasma de la célula se destruye durante el tratamiento hipotónico. ISKANDER (1979), presentó un método por el cual el citoplasma quedaba conservado, cambiando la presión osmótica de la solución hipotónica de unos 77 mOsmol (usada en las técnicas convencionales) hasta 285 mOsmol, que es casi la concentración de una solución isotónica. HUBER y cols. (1983), usaron 200 mOsmol en combinación con un cuidadoso enfriamiento de células fijadas al portaobjetos.

Con el citoplasma conservado, puede obtenerse una identificación mucho más precisa del micronúcleo, pudiendo ser fácilmente analizada su distribución celular (HUBER y cols., 1983).

Los micronúcleos corresponden a fragmentos acéntricos o cromosomas que no se incorporaron al núcleo hijo durante la mitosis. Esto indica que la expresión de micronúcleos es altamente dependiente de la cinética de reproducción celular. La proporción de linfocitos que se dividen en cultivo, depende no solamente de la respuesta a agentes mutágenos sino también a variaciones inter e intraindividuales. Por tanto, la estandarización del tiempo de cultivo para obtener una respuesta máxima después del tratamiento clastogénico es difícil. Para superar esta dificultad se desarrolló el procedimiento modificado de coloración arlequín (HUBER y BAUCHINGER, 1990).

III.3.2.3. Procedimiento modificado de coloración arlequín

PINCU y cols. (1984) desarrollaron una modificación de la técnica FPG de coloración arlequín (PERRY y WOLFF, 1974), que proporciona una identificación fácil de los linfocitos en multiplicación, que presentan los núcleos de color azul,

respecto de las células no proliferantes que presentan núcleos rojos. Los micronúcleos sólo se cuentan en las células con núcleos azules. La coloración diferencial se conseguía con una incorporación continua de altas concentraciones de bromodeoxyuridina (BrdU).

Los resultados pusieron de manifiesto que con la aplicación del procedimiento de coloración arlequín, los problemas cinéticos de las células en el ensayo de micronúcleos, pueden reducirse. Sin embargo, esta técnica está influenciada por la concentración de BrdU, que podía interactuar con un agente mutágeno en la inducción de micronúcleos (FENECH y MORLEY, 1985). También observaron otra desventaja ya que las células del primer ciclo celular se encuentran mezcladas con las del segundo ciclo. Para resolver este problema cinético, en el ensayo de micronúcleos, sugirieron el método autoradiográfico y el de bloqueo citoquinético, para identificar micronúcleos en linfocitos que se han dividido una sola vez (HUBER y BAUCHINGER, 1990).

III.3.2.4. Método autoradiográfico

Consiste en la utilización de timidina tritiada 48 horas después de la estimulación con fitohemaglutinina. Las células que incorporan timidina tritiada en la fase S, pueden posteriormente identificarse tras la división celular por sus núcleos marcados. El recuento de micronúcleos queda reducido a las células que se han dividido una sola vez a las 72-84 horas (FENECH y MORLEY, 1985 a, b). El método autoradiográfico, sin embargo, no puede ser utilizado para un análisis fiable de frecuencias de base, porque las aberraciones cromosómicas y, también de micronúcleos, están inducidos por los rayos beta emitidos por el tritio. Además como técnica de rutina el método es extraordinariamente laborioso (HUBER y BAUCHINGER, 1990).

III.3.2.5. Técnica del bloqueo citocinético.

A pesar de la evolución de las técnicas e incluso con las más recientes mejoras del ensayo de los micronúcleos, el método todavía carecía de control sobre la proliferación celular, que afectaba desfavorablemente a su precisión: al producir una frecuencia basal elevada, perjudica la sensibilidad del test.

Este problema comenzó a resolverse satisfactoriamente en 1985 con FENECH y MORLEY que propusieron el bloqueo de la citoquinesis después de 44 horas de cultivo añadiendo citocalasina B (Cyt B). La Cyt B provoca el bloqueo de la división celular tras la primera división mitótica, por ello, todos los micronúcleos observados se han producido en la primera división celular, siendo la única técnica que controla la proliferación celular. En la práctica, la Cyt B provoca la formación de células binucleadas, células que sólo se dividen una vez. Los micronúcleos se cuentan exclusivamente en el citoplasma de estas células binucleadas.

En definitiva, son cultivos de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina para provocar su proliferación celular y bloqueados tras su primera división celular con Cyt B. La frecuencia de células binucleadas en cultivo varía de 5 a 50% según el tiempo de cultivo. Ocasionalmente se pueden observar células tri o cuadrinucleadas, pero estas se excluyen sistemáticamente de la evaluación.

La frecuencia espontánea de micronúcleos en células binucleadas de ocho donantes sanos fue de $4,4 \pm 2,6$ micronúcleos por 500 células bloqueadas por citoquinesis, obteniéndose una respuesta lineal tras la irradiación "in vitro" de linfocitos de 8 donantes con 1-4 Gy. En 1986, FENECH y MORLEY establecieron una relación lineal dosis-efecto con dosis por debajo de 0,5 Gy.

Utilizando la técnica del bloqueo citogenético MITCHELL y NORMAN (1987) obtuvieron curvas dosis respuesta no lineales para la producción de micronúcleos inducidos por 0,05-0,5 Gy de rayos gamma (Co^{60}) y rayos X (90 Kvp) con desviaciones significativamente mayores de las curvas a dosis por encima de 0,15 Gy.

RAMALHO y cols. (1988) compararon la producción de micronúcleos inducidos por radiación, determinados por el método de citochalasinina B o por el procedimiento modificado del arlequín. Se encontró que el procedimiento de citochalasinina B era más eficiente para detectar fragmentos inducidos. En experimentos de fraccionamiento de la dosis pudo demostrarse que la producción de micronúcleos refleja fragmentos acéntricos asociados con aberraciones de tipo intercambio así como exceso de cromosomas acéntricos. No se encontraron diferencias marcadas en las frecuencias de micronúcleos en células bloqueadas con citocalasina B cuando 200 cGy se fraccionaban con intervalos de 60-120 minutos o cuando 400 cGy se administraron en dos fracciones separadas por 180 minutos.

La técnica de micronúcleos determinados por el método de la citocalasina B se ha utilizado en dos estudios con 250 Kv de rayos X para su aplicación potencial como un método de dosimetría biológica de la radiación. Para exposiciones en un rango de dosis altas, los datos se adaptan al modelo Lineal Cuadrático (KORMOS y KOTELES, 1988; PROSSER y cols., 1988).

Las observaciones en relación con la edad, "in vivo", fueron obtenidas en estudios anteriores con un método convencional (FENECH y MORLEY, 1985; HOGSTEDT, 1984; NORMAN y cols., 1984, 1985) y posteriormente confirmado con el método de citochalasinina B para un grupo de 42 individuos con edades comprendidas entre 21-85 años (FENECH y MORLEY, 1985). Con el método de citocalasina B se encontró un incremento medio de 4,3% micronúcleos al año. Esta

estimación numérica es parecida a otros trabajos (HUBER y cols., 1983). Aunque, en dos estudios, el efecto "edad" no fue estadísticamente significativo (HUBER y cols., 1983; PROSSER y cols., 1988). Recientemente se ha demostrado un aumento de la radiosensibilidad de los linfocitos con la edad (JOKSIC y cols., 1997).

Usando el método de citocalasina B, pudieron detectarse variaciones interindividuales sobre la línea de base de micronúcleos, inducidos por radiación "in vitro" en muestras de sangre de 14 donantes con 3 Gy de rayos gamma con Cs137. (HUBER y cols., 1983).

En estos momentos, el test de micronúcleos con bloqueo citogenético en sus diferentes modalidades, se ha convertido en una prueba ampliamente aceptada para valorar la capacidad lesiva sobre el material genético de numerosos agentes, tanto físicos como químicos.

Este test se considera como una de las técnicas más modernas y precisas en la valoración de la capacidad de inducción de lesión genética de todo tipo de sustancias. El aumento de la frecuencia de presentación de micronúcleos está relacionada con la capacidad lesiva sobre el material genético de los agentes sometidos a estudio.

En general los linfocitos de sangre periférica han demostrado ser un indicador o sustrato sensible al daño cromosómico inducido tanto "in vivo" como "in vitro". Su utilización según EVANS y D'RIORDAU, (1975) tiene varias ventajas para el estudio de exposiciones "in vivo", en particular se considera que:

La mayoría de los linfocitos que circulan en sangre están en un estadio de descanso (GO o G1 del ciclo celular), es decir, presentan en el momento de una

exposición “in vivo” o antes de una estimulación mitogénica “in vitro”, una población celular sincrónica.

Los linfocitos de sangre periférica tienen un periodo de vida relativamente largo, una media de vida estimada de 3 años (DOLPHIN y cols., 1973); esto junto con la falta de proliferación “in vivo”, permite que el daño no reparado permanezca almacenado hasta que las células sean estimuladas para dividirse en cultivos celulares “in vitro”.

Las muestras de sangre pueden obtenerse fácil y repetidamente en personas expuestas, así como ser transportadas y almacenadas fácilmente. En la mayoría de los casos sólo se necesitan unas gotas de sangre para un análisis, y el experimento de micronúcleos puede realizarse con poca cantidad de sangre por cultivo (0.1 - 1ml, según el procedimiento utilizado), (COUNTRYMAN y HEDDLE, 1977).

En cultivo, los linfocitos de sangre periférica pueden ser fácilmente estimulados a dividirse y son una fuente excelente de mitosis.

La distribución de la sangre y la circulación a través del cuerpo permiten la detección de los efectos a exposiciones parciales en los linfocitos que circulan.

III.3.2.6. Factores determinantes en la medida de la frecuencia de micronúcleos.

Existen algunos factores que resultan de gran importancia a la hora de determinar la sensibilidad del test de micronúcleos. Estos factores condicionan la

frecuencia de micronúcleos en los linfocitos de las muestras analizadas, y su modificación supone una variación en la sensibilidad del test.

Basicamente, siete son los factores determinantes en la frecuencia de aparición de micronúcleos:

III.3.2.6.1. El cultivo celular de linfocitos.

III.3.2.6.2. La conservación del citoplasma celular.

III.3.2.6.3. Las técnicas de coloración utilizadas.

III.3.2.6.4. Los criterios de recuento de micronúcleos.

III.3.2.6.5. Los criterios de identificación de micronúcleos.

III.3.2.6.6. El tiempo de cultivo celular.

III.3.2.6.7. La frecuencia de aparición espontánea de micronúcleos en la muestra estudiada.

III.3.2.6.1. El cultivo celular de linfocitos

Los linfocitos de sangre periférica han demostrado ser un indicador o sustrato sensible del daño cromosómico inducido tanto "in vivo" como "in vitro". Su

utilización según EVANS y D'RIORDAN, (1975) tiene varias ventajas para el estudio de exposiciones "in vivo"; en particular se considera que:

a) La mayoría de linfocitos que circulan en sangre están en un estadio de descanso (G0 o G1 del ciclo celular), es decir, presentan en el momento de una exposición "in vivo" o antes de una estimulación mitogénica "in vitro", una población celular sincrónica.

b) Los linfocitos de sangre periférica tienen un periodo de vida relativamente largo, con una vida media aproximadamente de 3 años (DOLPHIN y cols., 1973); esto junto con la falta de proliferación "in vivo", permite que el daño no reparado permanezca almacenado hasta que las células sean estimuladas para dividirse en cultivos celulares "in vitro".

c) Las muestras de sangre pueden obtenerse fácil y repetidamente en personas expuestas, así como ser transportadas y almacenadas fácilmente. En la mayoría de los casos sólo se necesitan unas gotas de sangre para un análisis, y el experimento de micronúcleos puede realizarse con poca cantidad (entre 1 y 0.1 ml. de sangre por cultivo según la técnica empleada), (COUNTRYMAN y HEDDLE, 1977).

d) En cultivo, los linfocitos de sangre periférica pueden ser fácilmente estimulados a dividirse y son una fuente excelente de mitosis.

e) La distribución de la sangre y la circulación a través del cuerpo permite la detección de los efectos en las exposiciones parciales a los linfocitos que circulan.

Sin embargo, el test de los linfocitos presenta algunas desventajas. Por ejemplo, en los casos de exposiciones parciales, se observará un efecto disminuido debido a la dilución de linfocitos dañados con células normales en la masa sanguínea. Además, los linfocitos de sangre periférica inducidos a multiplicarse no representan una población uniforme celular, sino más bien una mezcla de varias subpoblaciones que se distinguen y difieren en sus respuestas a mitógenos y en la cinética de su proliferación. También pueden diferir en su respuesta a mutágenos; el mitógeno más comunmente usado, la fitohemaglutinina, estimula a los linfocitos que en su mayoría son linfocitos T, y su respuesta es fácilmente influenciada por reacciones inmunológicas que pueden variar según características del donante. Todo ello supone oscilaciones en la frecuencia basal de micronúcleos que pueden modificar la sensibilidad de la técnica.

III.3.2.6.2. La conservación del citoplasma celular

Se ha demostrado que la posibilidad de detección e identificación de los micronúcleos es más precisa si se realiza en células que mantienen su citoplasma intacto, y que se denomina habitualmente con citoplasma conservado (ISKANDER, 1979; HUBER y cols., 1983; HOGSTEDT, 1984).

La conservación del citoplasma se consigue usando una solución hipotónica que es más suave que la usada comunmente de 75 mM KCl (ISKANDER, 1979), o por una aplicación más suave de la misma KCl (HUBER y cols., 1983). La conservación del citoplasma elimina los problemas previos entre la ubicación o distribución de los micronúcleos con sus núcleos maternos que se realiza en base a la distancia entre los dos.

III.3.2.6.3. Las técnicas de coloración utilizadas

Las características de tinción de los micronúcleos son similares a las del núcleo principal de la célula. Las preparaciones de linfocitos para el análisis de micronúcleos se han teñido tradicionalmente con Giemsa, con lo que el micronúcleo tiene el mismo color o ligeramente más claro que el núcleo principal (COUNTRYMAN y HEDDLE, 1976). En ocasiones los micronúcleos pueden confundirse con otras partículas intracitoplasmáticas que también se colorean con Giemsa y presentan una forma similar. Este problema puede evitarse coloreando las preparaciones con Feulgen + (HUBER y cols., 1983).

Posteriormente se ha conseguido con coloración fluorescente de acridina-orange, usada originalmente para la observación de micronúcleos inducidos por colchicina en células de cultivo (STARR, 1963), pero adoptado 20 años después para la detección de micronúcleos de plantas (HAYASHI y cols., 1983), células de pulmón de hamster (LASNE y cols., 1984), y linfocitos humanos de sangre periférica (ALMASSY y KOTELES, 1984; ALMASSY y cols., 1986 a, b). Una desventaja de este último procedimiento es que se ha de usar un microscopio fluorescente que es significativamente más caro que un microscopio normal de luz transmitida, así como que la coloración fluorescente no es permanente y los portaobjetos deben ser recontados dentro de las 24 horas siguientes a su coloración.

III.3.2.6.4. Los criterios de recuento de micronúcleos

Las características del recuento de micronúcleos deben establecerse antes del comienzo del recuento y mantenerse sin cambios a través de todo el análisis. Hay varios criterios básicos, que se aplican para todas las situaciones (HEDDLE, 1973; COUNTRYMAN y HEDDLE, 1976; KREPINSKY y HEDDLE, 1983; ALMASSY y cols., 1987; PROSSER y cols., 1988).

Considerando las aportaciones descritas en las referencias bibliográficas mencionadas anteriormente y considerando las mejoras técnicas más recientes, estos criterios de recuento pueden resumirse de la siguiente forma:

1. El micronúcleo tiene que presentar la misma estructura y coloración que el núcleo principal.
2. El micronúcleo debe ser más pequeño que el núcleo principal: no debe superar la mitad del tamaño del núcleo principal o dos veces la longitud del cromosoma más largo.
3. El micronúcleo debe ser redondo o esférico y visiblemente separado del núcleo principal.
4. El micronúcleo no debe mostrar refracción visible a la luz, lo que lo diferencia de otros tipos de partículas no nucleares.
5. El micronúcleo muestra reacción positiva al Feulgen u otra tinción específica del DNA.
6. Los micronúcleos deben contarse exclusivamente en las células con citoplasma bien conservado.
7. La aparición de micronúcleos debe seguir la cinética de la división celular.

Teóricamente, un número indeterminado de MN podrían quedar ocultos al superponerse con el área nuclear imposibilitando su recuento, cumpliendo uno de los requisitos especificados para su desestimación (requisito nº 3). Sin embargo,

todas las situaciones que pudieran verse afectas por la aplicación de los criterios previamente enumerados, con el rechazo consiguiente, se deben aceptar como error metodológico de la técnica experimental, por ello, se considerarían de escasa influencia sobre el resultado final al aplicarse de forma homogénea en todas las muestras estudiadas.

III.3.2.6.5. Los criterios de identificación de micronúcleos previamente establecidos.

Resulta imprescindible determinar algunos factores que son fundamentales para la detección e identificación precisa de los micronúcleos. Estos factores, que son esenciales para determinar el número y características de los micronúcleos son:

1. La selección de la duración del cultivo celular: tiempo de cultivo.
2. La conservación del citoplasma celular mediante un tratamiento hipotónico apropiado.
3. La buena resolución de la coloración.
4. Criterios rígidos de identificación y recuento de micronúcleos.

III.3.2.6.6. El tiempo de cultivo celular

El tiempo de cultivo modifica el número de micronúcleos observados en la muestra (FENECH, 1986; ALMASSY y cols., 1987). Desde el momento en que los

micronúcleos se originan, bien de fragmentos acéntricos, o bien de cromosomas que no se incorporaron a núcleos hijos durante la división mitótica, es al final de la primera división celular el momento más precoz en el que pueden observarse los micronúcleos.

Puesto que los linfocitos en fase de proliferación no son una población sincronizada y todos los micronúcleos no aparecen tan precozmente, el número de micronúcleos puede incrementarse después de periodos de cultivo más prolongados. En linfocitos humanos, el momento de máxima frecuencia se alcanza entre la segunda y tercera división celular; es decir, después de aproximadamente 72 horas de cultivo (depende, en gran parte, de la media de crecimiento de la sangre del donante y de las condiciones específicas del laboratorio). En momentos más tardíos, la frecuencia de aparición de los micronúcleos alcanza un periodo de transición y al final disminuyen ostensiblemente. Esto parece debido a la dilución de las células micronucleadas con la población creciente de células normales y con la pérdida de células aberrantes (ALMASSY y cols., 1987).

En condiciones normales, es habitual el estudio de los micronúcleos a las 72 horas del comienzo del cultivo; aunque este periodo puede ser ajustado cada vez que ocurren anomalías en la proliferación celular.

III.3.2.6.7. La frecuencia de aparición espontánea de micronúcleos en la muestra estudiada.

Cada laboratorio ha de acumular sus propios datos sobre la frecuencia espontánea de micronúcleos en un amplio número de individuos, y que sean determinados bajo las mismas condiciones. Estos controles, denominados por algunos autores como "históricos", son una referencia imprescindible para conocer el rango de variabilidad de la técnica y se utilizan además, como comprobación de los

controles concurrentes en los estudios de población humana, en donde los incrementos no se esperan muy por encima de la media de los controles.

La edad tiene un efecto directo significativo sobre la aparición de los micronúcleos (NORMAN y cols., 1985; FENECH y MORLEY, 1986; JOKSIC y cols., 1997). Esto debe considerarse cuando se generan datos de control o se seleccionan controles en grupos. El sexo, por el contrario, no parece afectar a las frecuencias espontáneas de micronúcleos (NORMAN y cols., 1985).

III.3.2.7. Situación actual de la técnica de micronúcleos

Durante los últimos diez años, el test de micronúcleos con bloqueo citocinético, se ha utilizado como una de las últimas técnicas más modernas y precisas en la valoración de la capacidad de inducción de lesión genética.

Se ha utilizado para determinar la capacidad genotóxica de la gasolina (HOGSTEDT y cols., 1991), los bencenos y sus metabolitos (ROBERTSON y cols., 1991; YAGER y cols., 1990), algunos gases organoclorados de los frigoríficos y congeladores (NAGAYAMA y cols., 1993), el efecto de diversos tipos de pinturas (DIAZ y cols., 1990; PINTO y cols., 2000), plásticos (MAEKI-PAKKANEN y cols., 1991), exposición a vapores de mercurio (BARREGARD y cols., 1991), insecticidas (SURRELLES y cols., 1990), pesticidas (LUCERO y cols., 2000; GOMEZ-ARROYO y cols., 2000), y otras diferentes sustancias (PROSSER y cols., 1993; KOLBER, 1992; SLAVUTSKY y KNUUTILA, 1989; TORRES y cols., 2000; MARTELLI y cols., 2000; BATALHA y cols., 1999).

En un estudio realizado por LUCERO y cols. (2000), en 50 varones trabajadores en invernaderos sometidos a exposición de pesticidas se aplicó el test de MN no observándose diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos con respecto al grupo control. Sin embargo, GÓMEZ-ARROYO y cols. (2000) sí que encuentra diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos en floricultores mejicanos expuestos a pesticidas .

Se ha utilizado este test para valorar la calidad del agua del río Caí (TORRES DE LEMOS y cols., 2000), la polución ambiental (BATALHA y cols., 1999), así como para el estudio genotóxico en residentes próximos a plantas metalúrgicas (MARTELLI y cols., 2000) y próximos a Semipalatinsk (TANAKA y cols., 2000), lugar donde se produjo una explosión nuclear hace 40 años. En ambos estudios se han observado un aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos en dichos residentes.

También se ha utilizado en la valoración de diferentes terapias antileucémicas (MIGLIORE y cols., 1991) y de diversas drogas citostáticas (YAGER y cols., 1988; FERGUSON y cols., 1993; HOFFMAN y cols., 1993a, 1993b; JAGETIA y cols., 2000; DIGUE y cols., 1999; WEIDER y cols., 2000). DIGUE y cols. (1999) estudian in vitro el paclitaxel, droga antineoplásica, observando un aumento en la frecuencia de micronúcleos en los pacientes tratados.

Asimismo se ha estudiado el efecto del aciclovir en la inducción de MN en células irradiadas con rayos gamma (JAGETIA y cols., 2000), y de la ribavirina (JOKSIC y cols., 2000) apreciándose un aumento de la frecuencia de micronúcleos dosis dependiente con el fármaco, así como una disminución en la supervivencia celular.

Igualmente, se ha aplicado el test para el estudio de la sensibilidad en algunos cuadros patológicos o para poner de manifiesto diferentes sensibilidades en las subpoblaciones de linfocitos (MORIKAWA y cols., 1991; BAN y COLOGNE, 1992; KOLBER, 1992; WUTTKE y cols., 1993; JOKSIC y cols., 1997; PELEVINA y cols., 2000; LEE y cols., 2000; GIL y cols., 2000) y sus modificaciones en el almacenamiento de la sangre (MORIKAWA y cols., 1991; BAN y COLOGNE, 1992; KOLBER, 1992; WUTTKE y cols., 1993; JOKSIC y cols., 1997; PELEVINA y cols., 2000; LEE y cols., 2000; GIL y cols., 2000).

En un estudio realizado por PELEVINA y cols. (2000) sobre 700 niños con síndrome de radiosensibilidad sometidos a dosis bajas de irradiación se observa un aumento en la frecuencia de micronúcleos. Dicha población presenta un alto nivel espontáneo de linfocitos lo cual podría justificar el incremento de micronúcleos y por tanto su radiosensibilidad.

Se ha realizado varios estudios aplicando el test de micronúcleos en trabajadores sanitarios para comprobar el efecto lesivo de diferentes agentes físicos y químicos potencialmente lesivos a los que están expuestos. Así se ha estudiado la influencia de drogas antineoplásicas sobre farmacéuticos y enfermeras (WEIDERS y cols., 2000), mostrando un aumento en la frecuencia de micronúcleos en los linfocitos dichos trabajadores.

En otros estudios realizados en enfermeros y anestelistas expuestos a la inhalación de altos niveles de gases anestésicos (WEISNER y cols., 2001), se ha observado igualmente un efecto genotóxico en los linfocitos en función del incremento de la frecuencia de micronúcleos que se determinan en dichos profesionales.

Asimismo, se ha aplicado el test en trabajadores hospitalarios profesionalmente expuestos a rayos X y gamma (THIERENS y cols., 2000), apreciándose un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos describiéndose una frecuencia de micronúcleos de un 40% más alta en mujeres que en los hombres profesionalmente expuestos.

Por último, incluso se ha descrito un aumento en la frecuencia de micronúcleos en el personal sanitario expuesto a los ultrasonidos del ecodiagnóstico (GARAJ-VRHOVAC y cols., 1999, GARAJ-VRHOVAC y cols., 2000).

Se ha observado igualmente en un metaanálisis (NORMAN y cols., 2001) un aumento en la frecuencia de MN en pacientes sometidos a angiografías y urografías similar al producido por la radiación X "in vitro" con una dosis de 4cGy así como en pacientes sometidos a bajas dosis de radiación en radiología vascular (ALCARAZ Y cols., 2001).

Se ha empleado igualmente para comprobar el efecto lesivo sobre el material genético de diferentes agentes físicos potencialmente lesivos. El efecto de los campos magnéticos (SCARFI y cols., 1991), de las radiaciones ultravioletas de las lámparas halógenas sin protección de cristal (D'AGOSTINI y cols., 1993), la radiofrecuencia (GARAJ-VRHOAC y cols., 1992),

De los agentes físicos destacan los estudios realizados para determinar el efecto de las radiaciones ionizantes. Se han estudiado el efecto de las partículas alfa (BILBAO y cols., 1989), de la radiación gamma (KHADZMIDEKOVA, 1989; BALASEM y ALI, 1991; KIM y cols., 1993; BOREHAM y cols., 2000), de los rayos X (ALMASSY y cols., 1986; FENECH y MORLEY, 1986; CAMERON y NORMAN, 1987; EREXSON y cols., 1991; BAN y COLOGNE, 1992; ALCARAZ y cols., 2001), de los neutrones (BAN y cols., 1991; KIM y cols., 1993), de los protones (GREEN y cols.,

2001, JOKSIC y cols 2000), de la sinergia entre radiación ionizante y ultrasonidos (FUSIC y cols., 2000), radiaciones cósmicas (HEIMERS y cols., 1999), microondas (ZOTTI-MARTELLI y cols 2000) y de la comparación entre sus diferentes efectos tanto "in vitro" como "in vivo" (BILBAO y cols., 1989; GARAJ-VRHOAC y cols., 1992; BAN, 1993).

En 8 pacientes con cáncer de próstata (LEE y cols., 2000) se estudió el efecto de la radioterapia aplicando el test de micronúcleos y observándose un incremento cuadrático lineal en la frecuencia de micronúcleos con una dosis equivalente corporal total equivalente a la ecuación: $Y=14.6+9.2X D$.

Así mismo se ha estudiado el efecto de la radioterapia en pacientes con cáncer de mama (BURRILL y cols., 2000; BARBER y cols 2000) apreciándose un aumento de la radiosensibilidad en los linfocitos de pacientes con cáncer de mama. Esta radiosensibilidad podría ser una característica inherente asociada a la predisposición a padecer cáncer de mama.

Excepcionalmente se han realizado estudios en los que se compara la especie humana con otros mamíferos (KIM y cols., 1993). En la mayoría de los estudios publicados se concluye la eficacia del test de los MN para determinar el efecto de los diferentes agentes sobre el material genético (KHADZMIDEKOVA, 1989).

Recientemente se aplicó el test de los MN en pilotos del Concorde (ANNA HEIMERS., 2000). Dicho estudio muestra un aumento en la frecuencia de MN en los linfocitos de los pilotos debido a la influencia de las radiaciones cósmicas de alto LET.

Así mismo se ha aplicado el test en parejas con fracaso en la reproducción o con abortos de repetición (TRKOVA y cols., 2000) observándose un

aumento significativo en la frecuencia de MN lo cual podría sugerir un papel de inestabilidad cromosomal en el fracaso de reproducción.

Actualmente se esta aplicando para el estudio de la radiotoxicidad producida por la terapia con ^{131}I en pacientes con hipertiroidismo y carcinoma de tiroides (WATANABE y cols., 1998; GUTIERREZ y cols., 1999; MONSIEURS y cols., 2000; CANTENA y cols., 2000; GREEN y cols., 2001; ALCARAZ y cols., 2000; ALCARAZ y cols., 2001).

En un estudio realizado sobre 25 pacientes con cáncer de tiroides tratados con 3.7 GBq de ^{131}I (WATANABE y cols., 1998) se describe un incremento significativo en la frecuencia de MN después del tratamiento comparado con el grupo control, presentando una dosis equivalente corporal total para electrones de 0.33 ± 0.09 Gy.

GUTIÉRREZ y cols. (1999), estudia 47 pacientes con hipertiroidismo y 39 con cáncer de tiroides tratados con ^{131}I observando igualmente un incremento en la frecuencia de MN en los pacientes irradiados frente al control. Así mismo dicha frecuencia disminuye entre la 1 semana y el 6º mes probablemente debido a una reducción en el número de linfocitos una semana después del tratamiento con ^{131}I .

MONSIEURS y cols. (2000) estudiaron si existe una respuesta de adaptación en pacientes sometidos a tratamiento con ^{131}I . Aprecian que la dosis previa de ^{131}I puede actuar como una dosis de adaptación in vivo y producir una tolerancia a la radiación in vitro de linfocitos ocasionando así un descenso en el daño citogenético.

Durante los últimos años se está incidiendo sobre la relación que existe entre la presencia de una alta frecuencia de aberraciones cromosómica en linfocitos y la predisposición a cáncer (GUTIERREZ, 1999).

CAPITULO IV.-MATERIAL Y MÉTODO

IV. MATERIAL Y MÉTODO

IV.1. EXPOSICIÓN GENERAL. PROTOCOLO.

El estudio se ha dividido en 2 grupos de experiencias diferentes: en primer lugar, pretenden contrastar la técnica de micronúcleos utilizada; y posteriormente, intentar alcanzar los objetivos en los pacientes sometidos a las exploraciones y procedimiento médicos propuestos (ver fig.1).

En el primero grupo de experiencias se ha analizado la inducción de micronúcleos en linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica, irradiados “in vitro” con dos tipos de radiaciones diferentes (rayos X y radiación gamma) para establecer la frecuencia basal espontánea de micronúcleos en la población de nuestra región y obtener las respectivas curvas dosis-respuestas, tanto para rayos X como para radiación gamma.

Posteriormente, muestras de sangre tratadas con diferentes sustancias antioxidantes se exponen a radiación gamma con el objeto de obtener un segundo control de respuesta que permita determinar la variabilidad y sensibilidad del test de micronúcleos en linfocitos humanos irradiados.

En el segundo grupo de experiencias se ha estudiado la inducción de micronúcleos en linfocitos humanos irradiados "in vivo", obtenidos de sangre periférica de tres grupos de pacientes diferentes:

- 1.- Exploraciones complejas de radiodiagnóstico médico.
- 2.- Exploraciones diagnósticas con isótopos radiactivos.
- 3.- Pacientes sometidos a tratamiento ablativo de restos quirúrgicos de cancer de tiroides con ¹³¹I.

IV.2. DETERMINACIÓN DE LAS CURVAS DOSIS-RESPUESTA

IV.2.1. INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS CON RAYOS X.

Se han irradiado "in vitro" muestras de la sangre pertenecientes a 9 donantes supuestamente sanos con dosis bajas de rayos X (0 - 334 mGy), para determinar la frecuencia de aparición de micronúcleos (MN) en el citoplasma de linfocitos binucleados (CB) estimulados a dividirse con Fitohemaglutinina A (Sigma, Madrid) y bloqueados tras su primera división celular con citochalasina B (Sigma, Madrid), para ser analizados al microscopio, exclusivamente en células binucleadas con citoplasma (MNCB) conservado a las 72 horas de desarrollo del cultivo celular. Se pretende determinar la existencia de una relación de dependencia entre el aumento de la frecuencia de micronúcleos y la dosis de radiación administrada.

Los donantes son ocho hombres y una mujer, con edades comprendidas entre 41 y 75 años, y una media de 60 años de edad . De estos donantes se obtuvieron las muestras de sangre periférica (10 ml) en las venas de la flexura del codo que se trasvasaron a tubos cónicos estériles (IZASA S.A., Barcelona) para recolección de sangre al vacío y esterilizados por radiación gamma a 25 kGy/min, en los que previamente se había introducido 0,2 ml de heparina sódica al 5% (Roger, Barcelona).

Para la obtención de la curva dosis-respuesta “in vitro” se han utilizado:

- Veinticinco muestras sanguíneas como controles para determinar la frecuencia basal espontánea de micronúcleos en la células con bloqueo citocinético (MNCB).
- Dieciocho muestras sanguíneas irradiadas con diferentes dosis de rayos X para determinar la relación dosis efecto.

La irradiación se ha realizado con un aparato CGR con capacidad para radioscopia con intensificador de imagen y las siguientes características: 120 kV, 1.8 mA, filtro de 2.5 cm, Al y 100 cm DFO, siendo variable el tiempo que determina la dosis de radiación final administrada, en función de las lecturas dosimétricas realizadas (ver fig.2). Las dosis de rayos X administradas han estado comprendidas entre 0 y 334 mGy.

Posteriormente, las muestras de sangre se han cultivado en la Unidad de Cultivos Celulares del Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales de la Universidad de Murcia (S.A.C.E), siguiendo la técnica del bloqueo citocinético descrita inicialmente por FENECH y MORLEY (1986), y ligeramente modificada por nosotros al realizarse el cultivo sobre sangre total.

De cada muestra sanguínea utilizada en el estudio se obtuvieron dos cultivos diferentes y de cada uno de los cultivos se obtuvieron 3 preparaciones microscópicas que fueron estudiadas y analizadas por dos lectores independientemente. Así pues, de las 43 muestras de sangre estudiadas se realizaron 86 cultivos diferentes y se estudiaron 258 preparaciones microscópicas para determinar la frecuencia de micronúcleos (MNCB) en este apartado.

De los resultados obtenidos por los dos lectores se obtuvo el valor medio para la representación de los respectivos puntos de la curva dosis-respuesta. Por tanto cada valor de la curva dosis-respuesta corresponde a la media de seis lecturas diferentes sobre la misma muestra.

IV.2.2. INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS CON RADIACIÓN GAMMA.

Se han irradiado "in vitro" muestras de sangre de dos donantes supuestamente sanos con diferentes dosis de radiación gamma (0 - 16362 mGy), para determinar la frecuencia de aparición de micronúcleos en el citoplasma de linfocitos binucleados con citoplasma conservado y bloqueo citocinético con citochalasin B (CB). Se pretende determinar la existencia de una relación de dosis respuesta entre la frecuencia de aparición de micronúcleos y la dosis de radiación gamma.

Se han utilizado muestras de sangre de dos donantes supuestamente sanos, para determinar la frecuencia de aparición de micronúcleos en linfocitos humanos estimulados a dividirse con Fitoheماغlutinina A (Sigma, Madrid) y bloqueados tras su primera división celular con citocalasina B (Sigma, Madrid), para ser analizados al microscopio, exclusivamente en células binucleadas con citoplasma conservado.

Los donantes son dos varones de 56 y 61 años de edad respectivamente, no fumadores, sin enfermedad conocida y, por ello, considerados supuestamente sanos. Se obtuvieron muestras de sangre periférica (10 ml) de las venas de la flexura del codo que se trasvasaron a tubos cónicos estériles (IZASA S.A., Barcelona), para recolección de sangre al vacío, en los que se había introducido previamente 0,2 ml de heparina sódica al 5% (Roger, Barcelona).

Para la obtención de la curva dosis-respuesta "in vitro" con radiación gamma, se han añadido 2 muestras sanguíneas como controles para determinar la frecuencia basal espontánea de micronúcleos en las células con bloqueo citocinético (MNCB) y que se suman a la 25 muestras controles obtenidas en el apartado anterior; así mismo 12 muestras sanguíneas irradiadas con diferentes dosis de radiación gamma para determinar la relación dosis-efecto.

Para la irradiación se ha utilizado un Irradiador IBL 437 C del Centro Regional de Hemodonación de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, cuyo isótopo radiactivo es el Cs^{137} , con una actividad de 1700 Ci y que produce una exposición constante de 302.50 mGy/sg. Las diferentes dosis de exposición empleadas se obtuvieron mediante la modificación del tiempo de exposición, único factor que permite variar dicho aparato alcanzando los 16.362 mGy como dosis de radiación más elevada utilizada en este estudio (ver figs. 2 y 3).

Debido a que la exposición mínima que se puede obtener con el Irradiador IBL 437 C, en el momento del estudio, es de 302 mGy/s, siendo el tiempo mínimo de 1 segundo; se han utilizado diferentes espesores de blindaje de plomo (17 mm, 15 mm, 5 mm y 2 mm) para conseguir una disminución progresiva de la dosis de exposición que corresponden a los cuatro primeros puntos de la curva presentada. La dosis de radiación gamma administradas han estado comprendidas entre 0 y 16362 mGy.

Al igual que en la experiencia anterior las muestras de sangre irradiadas se cultivaron en la Unidad de Cultivos Celulares del Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales de la Universidad de Murcia, siguiendo la técnica del bloqueo citocinético de FENECH y MORLEY (1986).

De cada muestra sanguínea utilizada en el estudio, se obtuvieron dos cultivos diferentes. De cada uno de los cultivos se obtuvieron tres preparaciones que fueron estudiadas y analizadas por dos lectores diferentes. De las 14 muestras de sangre estudiadas, se realizaron 28 cultivos diferentes y 84 preparaciones microscópicas en este apartado. Con los resultados obtenidos por los dos lectores se obtuvo el valor medio para la obtención de las respectivas curvas dosis-respuesta. Por tanto cada valor de la curva dosis respuesta corresponde a la media de 6 lecturas diferentes sobre la misma muestra.

IV.2.3. INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN MUESTRAS SANGUÍNEAS TRATADAS CON SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES.

En esta experiencia se ha estudiado la influencia de diferentes sustancias químicas sobre la frecuencia de micronucleos inducida por radiación en muestras de sangre humana irradiadas in vitro. Las sustancias se han administrado en dos momentos diferentes: en una primera serie, se han disuelto en las muestras de sangre y posteriormente se someten a la exposición a radiación gamma (**muestras tratadas preirradiación**); en una segunda serie de experiencias son las muestras sanguíneas las que se irradian antes de la administración de las sustancias (**muestras tratadas postirradiación**). A su vez se preparan muestras de sangre que son tratadas con los antioxidantes y que no van a exponer a la radiación (**muestras tratadas no irradiadas, o controles**).

Los donantes han sido cuatro pacientes de 29, 43, 54 y 57 años de edad respectivamente. Los donantes no presentan antecedentes médicos de

interés y, como en todos los casos, se ha contado con su autorización expresa para el empleo de las muestras de sangre en la presente investigación.

Las muestras de sangre periférica, 16 ml por donante, han sido obtenidas de las venas de la flexura del codo e inmediatamente se han trasvasado en grupos de 2 ml a tubos estériles para recolección de sangre.

Las muestras que vamos a obtener de este grupo son las siguientes:

- **Muestras controles:** estas muestras de sangre son dobles y no van a ser tratadas con ningún tipo de sustancias; otras se irradiarán en las mismas condiciones que el resto de muestras irradiadas. Estas muestras al no ser tratadas con ninguna sustancia sirven para establecer la frecuencia basal o control de micronúcleos en linfocitos humanos.
- **Muestras tratadas con antioxidantes no irradiadas:** a estas muestras se les ha administrado la sustancia que se pretende estudiar pero no han sido expuestas a radiación ionizante. Por ello, se consideran como muestras controles para cada uno de los tratamientos ensayados, y servirán para determinar el efecto genotóxico de la sustancia ensayada directamente sobre la sangre "in vitro" sin el efecto de la radiación ionizante.
- **Muestras tratadas con antioxidantes e irradiadas:** a estas muestras se les ha administrado la sustancia a ensayar y posteriormente se van a someter a los efectos de la radiación ionizante.
- **Muestras irradiadas y posteriormente tratadas con antioxidantes:** estas muestras son irradiadas siendo tratadas posteriormente con sustancias antioxidantes.

Las sustancias químicas utilizadas en esta experiencia son las siguientes, y han constituido los siguiente grupos de muestras:

1. Controles
2. DMSO

3. Rutina
4. Diosmina
5. Procianidinas (P90)
6. Vitamina C

A continuación se describen las características de los diferentes grupos de sustancias:

IV.2.3.1. Muestras controles.

Se han obtenido diez muestras de sangre (2 ml por muestra) de cuatro donantes supuestamente sanos; cinco de las muestras son cultivadas sin ser irradiadas (**controles no irradiados**) y otras cinco son cultivadas tras irradiación con radiación gamma (**controles irradiados**).

Las muestras de sangre se irradian durante 40 segundos siendo la dosis de radiación previamente seleccionada y que corresponde exactamente a 206 cGy.

Los datos obtenidos del análisis de estas preparaciones servirán para establecer la frecuencia basal o control de MN y el efecto de la radiación ionizante in vitro sin la presencia de las sustancias ensayadas.

IV.2.3.2. Muestras tratadas con DMSO.

El DMSO es utilizado en esta experiencia como disolvente de tres de las sustancias químicas ensayadas: rutina, diosmina, P90. Para ser utilizadas son disueltas en 1 ml de DMSO, previamente preparado en disolución al 5% en agua estéril.

El DMSO al ser un agente antioxidante precisa ser ensayado aisladamente en varias muestras de sangre de cara a discriminar los efectos que podrían solaparse con el de las sustancias químicas que solubiliza. Para tal fin se han añadido 20 µl de DMSO al 5% a cinco muestras de sangre que van a ser irradiadas durante 40 seg junto al resto de las muestras irradiadas recibiendo 206

cGy de radiación gamma, y constituyendo un grupo diferente (grupo DMSO preirradiación).

A su vez contamos con tres muestras de sangre a las que se ha añadido 20 µl de DMSO que no se van a someter a los efectos de dicha radiación (grupo DMSO control).

IV.2.3.3. Muestras tratadas con rutina.

La rutina es un flavonoide puro insoluble en agua (Extrasynthese S.A., Genay, Francia). Para su utilización en esta experiencia se han disuelto 2 mg de rutina en 1 ml de DMSO al 5%. De esta disolución resultante se toman 20 µl que se añaden a 2 ml de sangre total en tres momentos diferentes respecto de la exposición a la radiación ionizante:

1. Inmediatamente **antes** de la exposición a la radiación (lote de rutina preirradiación).
2. Inmediatamente **después** de la exposición a la radiación ionizante (lote de rutina postirradiación).
3. Muestras no irradiadas (lote de rutina no irradiada o control).

La experiencia se ha realizado en cada uno de los cuatro donantes empleados, lo que ha supuesto 12 muestras sanguíneas, 24 cultivos de linfocitos, 72 preparaciones con 114 lecturas. De ellas, se ha obtenido el valor medio para su representación gráfica y tratamiento estadístico.

IV.2.3.4. Muestras tratadas con diosmina.

La diosmina es un flavonoide puro (Extrasynthese S.A., Genay, Francia). Para su utilización en esta experiencia se han disuelto 2 mg de diosmina en 1 ml de DMSO al 5%. De esta disolución resultante se toman 20 µl que se

añaden a 2 ml de sangre total en tres momentos diferentes respecto de la exposición a la radiación ionizante:

1. Inmediatamente **antes** de la exposición a la radiación (lote de diosmina preirradiación).
2. Inmediatamente **después** de la exposición a la radiación ionizante (lote de diosmina postirradiación).
3. Muestras no irradiadas (lote de diosmina no irradiada o control).

La experiencia se ha realizado en cada uno de los cuatro donantes empleados, lo que ha supuesto 12 muestras sanguíneas, 24 cultivos de linfocitos, 72 preparaciones con 114 lecturas. De ellas, se ha obtenido el valor medio para su representación gráfica y tratamiento estadístico.

IV.2.3.5. Muestras tratadas con Procianidinas (P90).

Las procianidinas son flavonoides extraídos de un extracto de uva previamente obtenido por nosotros (Castillo, 2001). La cantidad de este flavonoide utilizada es de 4 mg que se van a disolver en 1 ml de DMSO al 5%. De esta disolución resultante se toman 20 µl que se añaden a 2 ml de sangre total en tres momentos diferentes respecto de la exposición a la radiación ionizante:

1. Inmediatamente **antes** de la exposición a la radiación (lote de P90 preirradiación).
2. Inmediatamente **después** de la exposición a la radiación ionizante (lote de P90 postirradiación).
3. Muestras no irradiadas (lote de P90 no irradiada o control).

La experiencia se ha realizado en cada uno de los cuatro donantes empleados, lo que ha supuesto 12 muestras sanguíneas, 24 cultivos de linfocitos,

72 preparaciones con 114 lecturas. De ellas, se ha obtenido el valor medio para su representación gráfica y tratamiento estadístico.

IV.2.3.6. Muestras tratadas con vitamina C.

La vitamina C se presenta en ampollas de 5 ml, para utilizarla en este estudio se prepara mezclando 1 ml de la misma con 1 ml de agua destilada a una concentración final de 40 μ M. En este caso no se precisa la disolución con DMSO sino que se toman directamente 20 μ l que se añaden a 2 ml de sangre total en tres momentos diferentes respecto de la exposición a la radiación ionizante:

1. Inmediatamente **antes** de la exposición a la radiación (lote de Vit C preirradiación).
2. Inmediatamente **después** de la exposición a la radiación ionizante (lote de Vit C postirradiación).
3. Muestras no irradiadas (lote de Vit C no irradiada o control).

La experiencia se ha realizado en cada uno de los cuatro donantes empleados, lo que ha supuesto 12 muestras sanguíneas, 24 cultivos de linfocitos, 72 preparaciones con 114 lecturas. De ellas, se ha obtenido el valor medio para su representación gráfica y tratamiento estadístico.

En todos los casos, tras la irradiación se procede a cultivar 1 ml de sangre de cada una de las muestras en el laboratorio de Cultivos Celulares del SACE de la Universidad de Murcia siguiendo la técnica descrita por FENECH Y MORLEY(1986). De cada una de las muestras de sangre se han realizado dos cultivos diferentes, tras un periodo de 72 horas de cultivo se han obtenido tres preparaciones microscópicas por cultivo que han sido estudiadas por lectores diferentes. El resultado obtenido de cada muestra va a corresponder a la media resultante de seis lecturas diferentes sobre la misma muestra.

IV.3. INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN PACIENTES EXPUESTOS A RADIACIÓN IONIZANTE

IV.3.1. INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN PACIENTES IRRADIADOS EN EXPLORACIONES DE RADIODIAGNÓSTICO MÉDICO.

Este grupo lo conforman 25 pacientes de ambos sexos (3 hombres y 22 mujeres) con edad comprendida entre los 21 y 84 años y una edad media de 56 años, a los que se les ha realizado algún procedimiento diagnóstico y/o terapéutico en el Servicio de Radiología del Hospital General Universitario de Murcia (Unidad de Radiología Vascular e Intervencionista)(ver fig.4).

A cada uno de los pacientes se le han extraído muestras diferentes de sangre, en diferentes momentos de la exploración radiológica, para la determinación de la frecuencia de micronúcleos en el citoplasma de linfocitos binucleados, con citoplasma conservado y bloqueados con citochalasina B. Se pretende determinar si las dosis de radiación administradas "in vivo" al paciente durante la exploración radiológica supone un aumento de la frecuencia de aparición de micronúcleos (MNCB).

Las muestras sanguíneas se obtuvieron de sangre periférica en las venas de la flexura del codo mediante jeringas estériles de 10 ml. Posteriormente, se trasvasaron a tubos estériles para recolección de sangre al vacío. En todos los casos se ha contado con la autorización expresa de los pacientes para la donación de 10 ml de sangre y su empleo específico en la presente investigación.

A los 15 primeros pacientes se les han extraído 4 muestras sanguíneas diferentes para la determinación independiente de la frecuencia de micronúcleos que presentan:

- **Muestra o Tubo I:** Tres ml de sangre extraída antes de la exploración radiológica, recogida en tubo de 15 ml, conteniendo 0,2-0,3 ml de heparina al 5%. Es la sangre control que indicará la frecuencia espontánea, basal o de control de micronúcleos, **(controles no irradiados)**.

- **Muestra o Tubo II:** Tres ml de sangre extraída previa a la exploración radiológica, recogida en un tubo de 15 ml, conteniendo 0,2-0,3 ml de heparina al 5%. Posteriormente se ha mezclado con el mismo contraste utilizado en la exploración radiológica a una concentración del 5% (Hexabrix, Rovi, Madrid), **(controles no irradiados con contraste)**.
Las muestras I y II no se exponen a ninguna dosis de radiación ionizante.

- **Muestra o Tubo III:** Una muestra de 3ml de sangre obtenida antes de la irradiación del paciente, y que permanecerá sobre la superficie corporal del mismo continuamente dentro del haz primario de radiación, durante todo el tiempo de la exploración radiológica, **(muestra irradiada “in vitro”, sin contraste)**(ver fig.5).

Dado que este tubo debe permanecer en área del paciente en condiciones de esterilidad, previamente eran esterilizados en autoclave (Mediclave Selecta S-477 MED) por el procedimiento habitual.

Además, a las paredes externas anteriores de cada tubo se le adherían los cristales de termoluminiscencia previamente incluidos en una protección de polietileno negro, para su aislamiento frente a la luz ambiente, y que previamente era esterilizada, sin TLD, por ultravioleta en un aparato UV-2000 (Selecta, Madrid).

- **Muestra o Tubo IV:** Una muestra de 3 ml de sangre extraída directamente del paciente inmediatamente finalizada la exploración radiológica, recogida en tubos de 15 ml de capacidad con 0,2-0,3 ml de heparina sódica al 5%. Este tubo se supone irradiado y con contraste, siendo una muestra "in vivo" del paciente sometido, en las condiciones habituales de realización, a un estudio radiológico. La dosis de radiación recibida por la muestra que se extrae, es inferior o igual a la obtenida en el Tubo III, resultando imposible su cuantificación exacta. Por ello, en el estudio se consideran similares a las obtenidas en el Tubo III, **(muestra irradiada "in vivo" con contraste)**.
Las muestras III y IV son las muestras expuestas a dosis de radiación ionizante.

A los 10 pacientes restantes solo se le ha extraído 2 muestras de sangre diferentes, para la determinación independiente de la frecuencia de micronúcleos que presentan:

Muestra o Tubo I: Cinco ml de sangre extraída antes de la exploración radiológica, recogida en tubo de 15 ml, conteniendo 0,2-0,3 ml de heparina al 5%. Es la sangre control que indicará la lectura de fondo, inicial o de control de micronúcleos, **(muestras controles no irradiadas)**.

Muestra o Tubo II: Una muestra de 5 ml de sangre extraída directamente al paciente inmediatamente finalizada la exploración radiológica, recogida en tubos de 15 ml de capacidad con 0,2-0,3 ml de heparina sódica al 5%. Este tubo corresponde a una muestra de sangre del paciente irradiado "in vivo", **(muestra irradiada "in vivo")**.

Posteriormente, las muestras se han transportado al Servicio de Cultivos Celulares (S.A.C.E.) de la Universidad de Murcia, en donde se ha procedido a su cultivo en las condiciones descritas por FENECH y MORLEY (1986), y que se describirán en detalle posteriormente.

Las características específicas del cultivo y la complejidad de su desarrollo ha impuesto un ritmo máximo para la obtención de las muestras sanguíneas y su procesamiento de 2 pacientes/semana.

De cada paciente se han obtenido las muestras sanguíneas que se han cultivado por duplicado. Cada uno de estos cultivos se ha procesado independientemente, realizándose 3 preparaciones microscópicas para cada cultivo. El análisis o lectura microscópica de las preparaciones se ha llevado a cabo por dos personas individual e independientemente. Este análisis ha consistido en la determinación de la frecuencia de aparición de micronúcleos en el citoplasma de las células binucleadas con bloqueo citocinético. Para ello, se ha analizado el número de micronúcleos en 500 células binucleadas, en cada una de las preparaciones microscópicas obtenidas (MNCB/500).

En resumen, para cada una de las muestras sanguíneas se han realizado dos cultivos diferentes, 6 preparaciones microscópicas y 12 lecturas diferentes. De los 25 pacientes se han obtenido 80 muestras diferentes, de los que se han realizado 160 cultivos de linfocitos y 480 preparaciones microscópicas que se han producido 960 recuentos diferentes. Se ha contado manualmente unas 570.000 células con bloqueo citocinético. De las lecturas realizadas se han desestimado los valores máximo y mínimo y se ha obtenido el valor medio. Esta media aritmética es la que representa la muestra en cada paciente, tanto en el estudio estadístico como en sus representaciones gráficas.

IV.3.1.a. Preparación del contraste HEXABRIX®:

Para el estudio de las muestras no irradiadas pero en contacto con el contraste radiológico se ha tenido en cuenta que durante una exploración normal de coronariografía o arteriografía se suele utilizar entre 250-300 ml de contraste Hexabrix (Rovi, Madrid). En condiciones normales una persona presenta un promedio de seis litros de sangre total. La proporción resultante en el paciente es aproximadamente de 50 microlitros de Hexabrix por cada ml de sangre.

El contraste radiológico, para ser utilizado en el momento de la extracción, se ha preparado en tubo estéril y a partes iguales un ml de Hexabrix® y un ml de suero fisiológico.

A cada muestra sanguínea del estudio "in vitro", se añadía 0,1 ml de esta disolución (Hexabrix + suero fisiológico) que supone una concentración de contraste radiológico del 5%.

IV.3.2. INDUCCIÓN DE MICRONUCLEOS EN PACIENTES IRRADIADOS EN EXPLORACIONES DIAGNÓSTICAS DE MEDICINA NUCLEAR.

Este grupo está compuesto por 26 pacientes de ambos sexos (7 hombres, 19 mujeres), con edad comprendida entre los 27 y los 89 años y una edad media de 53.5 años; a los que se les ha realizado un procedimiento diagnóstico en el Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca" de Murcia. Los procedimientos diagnósticos realizados corresponden a exploraciones tales como gammagrafía mamaria (8 pacientes), gammagrafía paratiroidea (12 pacientes) y gammagrafía osea (6 pacientes)(ver fig.6).

A cada uno de los pacientes se le han extraído dos muestras diferentes de sangre, en diferentes momentos de la exploración radiológica, para la determinación de la frecuencia de micronúcleos en el citoplasma de linfocitos binucleados, con citoplasma conservado y bloqueados con citochalasina B. Se pretende determinar si las dosis de radiación administradas "in vivo" al paciente durante la exploración gammagráfica suponen un aumento de la frecuencia de aparición de micronúcleos.

Las muestras sanguíneas se obtuvieron de sangre periférica en las venas de la flexura del codo mediante jeringas estériles de 10 ml. Posteriormente,

se trasvasaron a tubos estériles para recolección de sangre al vacío. En todos los casos se ha contado con la autorización expresa de los pacientes para la donación de 10 ml de sangre y su empleo específico en la presente investigación.

A cada paciente se le ha extraído 2 muestras de sangre diferentes, para la determinación de la frecuencia de micronúcleos que presentan:

Muestra o Tubo I: Cinco ml de sangre extraída antes de la exploración gammagráfica, recogida en tubo de 15 ml, conteniendo 0,2-0,3 ml de heparina al 5%. Es la sangre control que indicará la frecuencia basal espontánea, inicial o de control de micronúcleos, **(muestras controles no irradiadas)**.

Muestra o Tubo II: Una muestra de 5 ml de sangre extraída al paciente inmediatamente finalizada la exploración gammagráfica, recogida en tubos de 15 ml de capacidad con 0,2-0,3 ml de heparina sódica al 5%. Este tubo corresponde a una muestra de sangre del paciente irradiado "in vivo", **(muestras irradiadas "in vivo")**.

Posteriormente, las muestras se han transportado al Servicio de Cultivos Celulares (S.A.C.E.) de la Universidad de Murcia, en donde se ha procedido a su cultivo en las condiciones descritas por FENECH y MORLEY (1986), y que se describirán en detalle posteriormente.

Las características específicas del cultivo y la complejidad de su desarrollo ha impuesto un ritmo máximo para la obtención de las muestras sanguíneas y su procesamiento de 4 pacientes/semana. De cada paciente se han obtenido 2 muestras sanguíneas diferentes que se han cultivado por duplicado. Cada uno de estos cultivos se ha procesado independientemente, realizándose 3 preparaciones microscópicas diferentes para cada cultivo. El análisis y lectura microscópica de las preparaciones se ha llevado a cabo por dos personas individual e independientemente. Este análisis ha consistido en la determinación de la frecuencia de aparición de micronúcleos en el citoplasma de las células binucleadas con bloqueo citoquinético. Para ello, se ha analizado el número de

micronúcleos en 500 células binucleadas en cada una de las preparaciones microscópicas obtenidas (MNCB/500CB).

En resumen, para cada una de las dos muestras sanguíneas se han realizado dos cultivos diferentes, 6 preparaciones microscópicas y 12 lecturas diferentes. Así pues, de los 26 pacientes se han realizado 52 cultivos diferentes de los que se obtuvieron 156 preparaciones microscópicas que posibilitaron 312 lecturas diferentes (aproximadamente 156.000 células contadas manualmente). Esta media aritmética es la que representa la muestra en cada paciente, tanto en el estudio estadístico como en sus preparaciones gráficas.

IV.3.3. INDUCCIÓN DE MICRONUCLEOS EN PACIENTES IRRADIADOS EN ACTIVIDADES TERAPEUTICAS DE MEDICINA NUCLEAR.

Este grupo está compuesto por 25 pacientes de ambos sexos (3 hombres, 22 mujeres), con edad comprendida entre los 11 y 67 años y una edad media de 43 años, a los que se les ha realizado tratamiento ablativo de los restos quirúrgicos de los diferentes tipos de cáncer de tiroides en el Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario “Virgen de la Arrixaca” de Murcia. Los tipos de cáncer tratados son los siguientes: carcinoma papilar (16 pacientes), carcinoma folicular (6 pacientes), carcinoma medular (2 pacientes), carcinoma mixto (1 paciente)(ver fig.7).

A cada uno de los pacientes se les ha extraído dos muestras diferentes de sangre, para la determinación de la frecuencia de micronúcleos en el citoplasma de linfocitos binucleados, con citoplasma conservado y bloqueados con citochalasina B. Se pretende determinar si las dosis de radiación administradas “in vivo” al paciente durante el tratamiento suponen un aumento de la frecuencia de aparición de micronúcleos.

Las muestras sanguíneas se obtuvieron de sangre periférica en las venas de la flexura del codo mediante jeringas estériles de 10 ml. Posteriormente, se trasvasaron a tubos estériles para recolección de sangre al vacío. En todos los casos se ha contado con la autorización expresa de los pacientes para la donación de 10 ml de sangre y su empleo específico en la presente investigación.

A cada paciente se le ha extraído 2 muestras de sangre diferentes, para la determinación independiente de la frecuencia de micronúcleos que presentan:

Muestra o Tubo I: Cinco ml de sangre extraída antes de administrar la dosis ablativa de I^{131} , recogida en tubo de 15 ml, conteniendo 0,2-0,3 ml de heparina al 5%. Es la sangre control que indicará la lectura de fondo, inicial o de control de micronúcleos (**muestras controles no irradiadas**).

Muestra o Tubo II: Una muestra de 5 ml de sangre extraída al paciente en el momento de su alta, recogida en tubos de 15 ml de capacidad con 0,2-0,3 ml de heparina sódica al 5%. El periodo de 3 días es el tiempo habitual y utilizado para valorar la exposición a radiación ionizante, y corresponde al tiempo de permanencia del paciente en el hospital, tras la administración del I^{131} . Este tubo corresponde a una muestra de sangre del paciente irradiado “in vivo” (**muestras irradiada “in vivo”**).

Posteriormente, las muestras se han transportado al Servicio de Cultivos Celulares (S.A.C.E.) de la Universidad de Murcia, en donde se ha procedido a su cultivo en las condiciones descritas por FENECH y MORLEY (1986), y que va a ser expuesta con detalle posteriormente. Las características específicas del cultivo y la complejidad de su desarrollo ha impuesto un ritmo máximo para la obtención de las muestras sanguíneas y su procesamiento de 2 pacientes/semana.

De cada paciente se han obtenido 2 muestras sanguíneas diferentes que se han cultivado por duplicado. Cada uno de estos cultivos se ha procesado independientemente, realizándose 3 preparaciones microscópicas diferentes para cada cultivo. El análisis o lectura microscópica de las preparaciones se ha llevado a cabo por dos personas individual e independientemente. Este análisis ha consistido en la determinación de la frecuencia de aparición de micronúcleos en el citoplasma de las células binucleadas con bloqueo citoquinético. Para ello, se ha analizado el número de micronúcleos en 500 células binucleadas en cada una de las preparaciones microscópicas obtenidas.

En resumen, para cada una de las dos muestras sanguíneas se han realizado dos cultivos diferentes, 6 preparaciones microscópicas y 12 lecturas diferentes. Así pues, de los 25 pacientes se han realizado 50 cultivos de linfocitos diferentes, de los que se han obtenido 156 preparaciones microscópicas que ha supuesto 312 lecturas diferentes, con un recuento manual de unas 150.000 células con bloqueo citocinético. La media aritmética es la que representa la muestra en cada paciente, tanto en el estudio estadístico como en sus representaciones en gráficas y tablas.

IV.4. TÉCNICA DE CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS

Se ha utilizado la técnica descrita por FENECH y MORLEY (1986) ligeramente modificada por nosotros para el comienzo del cultivo a partir de sangre total y que consta de los siguientes pasos:

1- Se obtienen las muestras de sangre periférica de la vena del codo en jeringas estériles conteniendo 0.2-0.3 ml de heparina.

2- El medio de cultivo utilizado es específico para el desarrollo de linfocitos y está compuesto por:

Medio Ham F10	85%
Suero bovino fetal	15%
Fitohemaglutinina	16 microgramos/ml

Penicilina sódica	100 UI/ml
Estreptomina	100 microgramos/ml

Tanto el medio de cultivo Ham F10, el suero bovino fetal (Sigma, Madrid) como la penicilina sódica y estreptomina (Sigma, Madrid) se preparan en concentraciones alícuotas para la realización de 100 ml de cultivo en cabina de flujo laminar preparándose posteriormente el medio de cultivo en alícuotas de 9 ml, en frascos estériles de 50 ml para cultivo.

3- En cabina de flujo laminar (ver fig.8), cada frasco de cultivo se agrega 1 ml de sangre heparinizada obtenida de la muestra sanguínea del paciente.

4- Se cultiva en estufa de cultivo en condiciones de 37 °C y ambiente enriquecido con CO₂ al 15% durante 72-76 horas.

La técnica exige el bloqueo de la división celular tras la primera división mitótica, ya que permite diferenciar los micronúcleos producidos solo en la primera división celular. Para ello se ha utilizado citocalasina B (Cyt B) (Sigma, Madrid) diluída en dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma, Madrid) en la proporción de 2 mg de Cyt B por 1 ml de DMSO. La citocalasina B se ha utilizado en las presentaciones de 1 mg y 5 mg, y se agregaba a cada cultivo a las 44 horas del mismo en cabina estéril.

5- Tras la adición de Cyt B, los tubos de cultivo volvían a introducirse en la estufa de cultivo durante otras 28-32 horas.

6- Transcurrido este periodo se trasvasa el contenido de los frascos de cultivo a tubos cónicos de 15 ml y se centrifuga durante 5-6 minutos a 1000 rpm (Heraeus, Minifuge T y Madrid).

7- Se extrae el sobrenadante y se agregan 8 ml de solución hipotónica de KCl (Probos, Madrid) 0,075 M (5,59 gramos de KCl en un litro de agua destilada). Esta

mezcla era de nuevo incubada a 37 °C durante 3 minutos en ambiente enriquecido de CO₂.

8- La solución incubada, se centrifuga a 800 rpm durante 8 minutos.

9- Se decanta el sobrenadante y se resuspende en 7-8 ml de fijador (3 partes de alcohol metílico, 1 parte de ácido acético glacial).

10- Se centrifuga a 1000 rpm durante 5-6 minutos.

11- Estos dos últimos pasos (fijación y centrifugación) se repiten 3 ó 4 veces, hasta obtener una disolución transparente.

12- Las células así obtenidas se resuspenden en un volumen apropiado de fijador (0,5-1,0 ml).

13- Las preparaciones microscópicas se realizan goteando la suspensión celular, sobre portaobjetos enfriados previamente y se secan en corriente de aire suave.

14- Una vez secos, se procede a su tinción, de la siguiente forma:

a) Los portaobjetos se introducen en solución de May-Grünwald puro (Analema, Vorquímica, Vigo) durante tres minutos.

b) Posteriormente, dos minutos más en solución de May-Grünwald al 50% (50% May-Grünwald y 50% agua destilada).

c) Sin lavar, se pasan a solución Giemsa (Standar Fluka) diluída en tampón fosfato 1:6 (5 partes de tampón fosfato M 100 pH 6,2 y 1 parte de Giemsa) durante dos minutos.

El tampón fosfato M 100 se ha obtenido diluyendo en un litro de agua bidestilada:

Na H ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	1,560 gr
Na HPO ₄ · 12H ₂ O	1,789 gr

- d) Se lavan las preparaciones sumergiéndolas una por una en tampón fosfato M 100 pH 6,2.

- e) Por último, se secan al aire y se montan con cubreobjetos, estando definitivamente preparadas para su estudio a microscopía óptica (ver fig.8,9).

IV.4.1. PREPARACIÓN DE LA FITOHEMAGLUTININA (PHA):

La función de la PHA es estimular la división o proliferación de los linfocitos que en condiciones normales no se dividen.

La PHA viene preparada en frasco estéril de 5 mg. Para su utilización, se disuelve en condiciones estériles, la PHA (5 mg) en 5 ml de medio HAM F10 y se guarda en el congelador. Para este cultivo se precisan 16 µg/ml de PHA. Si se preparan 100 ml de medio de cultivo, se necesitan 1.6 ml de esta disolución para obtener los 1600 µg necesarios en 100 ml de medio de cultivo.

IV.4.2. PREPARACIÓN DE LA CITOCHALASINA (CYT B):

Para su utilización en los cultivos celulares, la Cyt B se ha preparado de la siguiente forma:

- Se disuelve Cyt B en DMSO: 0,5 ml de DMSO en las presentaciones de 1 mg de Cyt B y 2,5 ml de DMSO en las presentaciones de 5 mg de Cyt B.

- Cada 0,1 ml de esta mezcla, en cabina estéril, son trasvasados a tubos de 1,5 ml de capacidad. La proporción por 0,1 ml de mezcla es de 100 microlitros de DMSO y 200 microgramos de Cyt B.
- A cada tubo se le añade 0,9 ml de suero fisiológico, con lo que se obtenía un volumen de 1 ml, que presentaba la siguiente proporción: 0,9 ml de suero fisiológico, 0,1 ml de DMSO y 200 microgramos de Cyt B.
- Cada tubo es congelado a -70 °C y sólo se desconge laban en el momento de ser utilizados, es decir, para su adición al medio de cultivo.

La concentración de Cyt B que se añade a cada cultivo es de 3 microgramos/ml. Cada cultivo tiene aproximadamente 10 ml, por lo que la proporción a añadir es de 30 microgramos de Cyt B. Realizando las concentraciones adecuadas, se obtiene la cantidad de 150 microlitros de la mezcla preparada por cultivo realizado.

IV.5. DETERMINACIÓN FÍSICA DE LAS DOSIS DE RADIACIÓN

Una parte significativa del trabajo de investigación ha consistido en la determinación, por procedimientos físicos, de las dosis de radiación ionizante a la que han sido expuestos, tanto las muestras sanguíneas "in vitro", como los pacientes de radiodiagnóstico estudiados en esta investigación.

La determinación de la dosis de radiación ionizante ha sido pues, un paso previo para establecer y relacionar el efecto biológico que se pretende estudiar, permitiendo establecer las curvas dosis-respuestas en dicho ensayo. Por ello, se ha elegido el mejor procedimiento del que se dispone en nuestro medio, aceptado durante años como la técnica más adecuada: la dosimetría de termoluminiscencia (TLDs).

El Servicio de Dosimetría Externa del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) del Ministerio de Industria y Energía, ha mantenido un programa en el ámbito de la Dosimetría de Radiaciones con especial consideración en materiales de termoluminiscencia (ver figs. 2 y 3).

Este Servicio del CIEMAT ha sido quien ha proporcionado los dosímetros del termoluminiscencia y ha realizado la lectura de los mismos, aportando la dosis de radiación administrada cada uno de los pacientes en este estudio.

Los dosímetros de termoluminiscencia utilizados son cristales de Fluoruro de Litio: Mg, Cu, P (GR-200[®], Conqueror Electronics Technology Co. Ltd, China). Los detectores tienen forma redondeada (pastilla) de 4-5 mm de diámetro por 1.0 mm de espesor. Para su empleo, dos detectores de TLD se encapsulan individualmente en una bolsa de plástico transparente que se sella térmicamente quedando ambos detectores protegidos frente al exterior y con un tamaño de 8 mm por 16 mm. La bolsa se rotula indeleblemente con un código que identifica a los detectores que contiene. El tamaño y la posibilidad de ver los detectores facilita la colocación de los dosímetros a nivel del foco y receptor del haz de radiación. Los detectores se preparan simultáneamente en 23 bolsas que contienen dos detectores cada una y 1 bolsa con cuatro detectores que se etiqueta como CONTROL con objeto de sustraer la dosis debida a la radiación natural durante el período de tiempo desde la preparación de los detectores hasta su lectura tras haber sido expuestos con los pacientes. Esta corrección permite que el lote de dosímetros pueda ser utilizado durante 2-3 meses antes de su remisión para la lectura y evaluación de las dosis. Se ha constatado que los dosímetros no producen efecto visible alguno sobre las placas radiográficas obtenidas.

Los detectores se procesan en un lector automático Harshaw 5500 para pastillas. El calentamiento se basa en la inyección de nitrógeno caliente, siendo posible la programación de los perfiles tiempo-temperatura adecuados

para diferentes materiales termoluminiscentes. En base a la experiencia en el CIEMAT, para el LiF:Mg,Cu,P se ha definido un ciclo de lectura que somete el detector a una tasa de calentamiento lineal de 15 °C/s desde 50 °C hasta 275 °C, manteniéndose esta temperatura durante 12.7 s, siendo el tiempo total de lectura de 26.7 s. Este ciclo asegura la lectura completa del detector hasta dosis superiores a 1 Gy, siendo posible incluso su reutilización inmediata. La evaluación de las dosis se basa en el análisis simplificado de las curvas de emisión empleando para ello los programas informáticos desarrollados en el CIEMAT.

Algunos autores han reportado un descenso en la sensibilidad del LiF:Mg,Cu,P con el número de lecturas o usos de los detectores. Aunque tras unas decenas de lecturas se ha corroborado un descenso en la sensibilidad de los detectores de hasta el 25%, este efecto es prácticamente inapreciable en dos lecturas consecutivas. Por ello, tras efectuar la lectura de los detectores expuestos con los pacientes se procede a una preparación de los detectores y a una irradiación de los mismos a una dosis conocida, procediéndose de nuevo a su lectura, la cual proporciona el factor individual de calibración para cada detector. Estos factores se aplican a las lecturas anteriores, siendo esperable una incidencia nula del efecto de descenso de la sensibilidad.

IV.6. DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS

Se ha utilizado un microscopio óptico tipo LABORLUX 12 (Leitz, Alemania), utilizando sistemáticamente una magnificación de 400 aumentos, y en los casos de comprobación y/o discriminación hasta 1000 aumentos con aceite de inmersión. Su empleo se nos ha permitido en el Servicio de Microscopía Electrónica del Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales y en el Área de Radiología de la Universidad de Murcia (ver fig.10).

En los cultivos de linfocitos humanos tratados con citochalasina B, y por tanto con Bloqueo Citocinético (CB), se han estudiado las células binucleadas, bloqueadas tras la primera división mitótica y que presentan su citoplasma

conservado. Estas células binucleadas podrán presentar en su citoplasma la presencia de 1 o más micronúcleos como expresión del daño inducido por la radiación (FENECH y MORLEY, 1986).

El recuento de micronúcleos se ha realizado sobre 500 células bloqueadas (CB) en cada una de las seis preparaciones que se han realizado por cada uno de los dos cultivos realizados en cada una de las muestras de sangre obtenidas (1 muestra de sangre, 2 cultivos celulares y 6 preparaciones histológicas 2 lectores diferentes). Por lo que, aunque las cifras de micronúcleos se presentan por 500 células bloqueadas (MN/500 CB), la lectura corresponde al análisis de 3000 CB para cada uno de los puntos mostrados y determinados por dos personas independientemente.

El recuento se ha realizado desconociendo las características de la preparación observada, obteniéndose un único valor para cada punto correspondiéndose con la media de las lecturas para cada una de las muestras y realizando el redondeo del resultado en caso de valores con decimales.

Los criterios para el recuento de micronúcleos se han establecido y seguido de forma estricta, de acuerdo con la propuesta de ALMASSY y cols.(1988), al ser los más comúnmente aceptados por los diversos autores.

Estos criterios son los siguientes:

1. Los micronúcleos deben tener la misma estructura que el núcleo principal.
2. Los micronúcleos deben ser más pequeños que el núcleo principal: no deben exceder de la mitad del tamaño del núcleo principal o dos veces la longitud normal de un cromosoma.
3. Los micronúcleos deben ser redondos o esféricos y separados visiblemente del núcleo principal.

4. En contraste con las partículas no nucleares, los micronúcleos no deben mostrar refractibilidad a la luz.

5. Los micronúcleos se cuentan sólo en células que tengan conservado el citoplasma.

6. La frecuencia de aparición de los micronúcleos ha de seguir la cinética de división celular.

IV.7. MORFOMETRÍA DE MICRONUCLEOS

El análisis de la morfometría celular se ha realizado en la Unidad de Estudio y Proceso Digital de Imágenes del Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales (S.A.C.E.) de la Universidad de Murcia (ver fig.11).

Los datos del muestreo se han realizado sobre 151 células binucleadas con presencia de micronúcleos y citoplasma conservado, del grupo expuesto a radiación gamma. En estas células se han medido los siguientes parámetros: área total del linfocito, área del núcleo del linfocito, área del micronúcleo, relación entre las áreas del micronúcleo y del núcleo y relación entre las áreas del micronúcleo y del linfocito.

Se ha utilizado el sistema MIP-Microm Image Processing (Microm España, Madrid), basado en el sistema IMCO 10. La cámara de vídeo estaba conectada a un microscopio óptico AXIOSKOP x 40 (Zeiss). La lectura de imágenes han sido grabadas en disco, con campo de observación fijo (x1800).

IV.8. ESTUDIO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico ha consistido en comparaciones entre grupos realizando contrastes de igualdad de medias mediante análisis de varianza (ver fig.12).

Se han determinado ecuaciones polinómicas mediante análisis de regresión y correlación polinómicas. También se han aplicado análisis de regresión y correlación lineales.

Se han considerado con significación estadística cuando se ha obtenido una p menor de 0,05 ($p < 0,05$).

Otros dos parámetros diferentes se han utilizado:

IV.8.1. Factor de protección (FP).

La capacidad de protección de una sustancia radioprotectora, expresada como porcentaje de protección descrito por SARMA y KESAVAN (1993), se expresa mediante la siguiente expresión:

$$\text{FP (\%)} = (F_{\text{control}} - F_{\text{tratados}} / F_{\text{control}}) \times 100$$

En la anterior expresión tenemos que:

FP es la magnitud de protección expresada en %

F_{control} es la frecuencia de MN en animales controles irradiados

F_{tratados} es la frecuencia de MN en animales irradiados y tratados.

IV.8.2 Dosis equivalente corporal total,(DECT).

La DECT tras la terapia con I^{131} se ha calculado a partir del número de micronúcleos presentes en 500 CB de pacientes tras 3 días de la administración de la dosis de I^{131} y comparada con la dosis de radiación X y radiación gamma expuestas "in vitro" que produciría una idéntica frecuencia de micronucleos en 500 células binucleadas (WATANABE, 2000).



Fig.1.: Esquema General del Protocolo.



Fig.2.: Procedimientos para la determinación física de las dosis de radiación administradas.



Fig.3.: Instrumental utilizado en las experiencias "in vitro": Curvas dosis-respuesta.



Fig.4.: Radiodiagnóstico: determinación física de las dosis de radiación administradas.



Fig.5.: Procedimientos para la irradiación de las muestras "in vitro" en pacientes de radiodiagnóstico.

Material y método

Radiación gamma



GAMMAGRAFÍA



25
PACIENTES

2
Muestras/Paciente



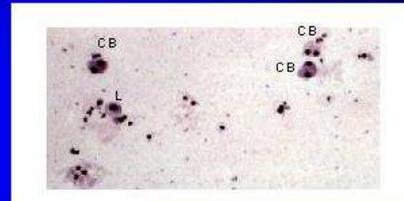
Fig.6.: Obtención de las muestras sanguíneas en los pacientes sometidos a gammagrafía.

Material y método

Radiación beta



CÁNCER DE TIROIDES



25
PACIENTES

2
Muestras/Paciente

Fig.7.: Obtención de las muestras sanguíneas en los pacientes irradiados por cáncer de tiroides.

Material y método

Técnica de MN en cultivo de linfocitos con bloqueo citocinético

(FENECH y MORLEY 1985, 2000)

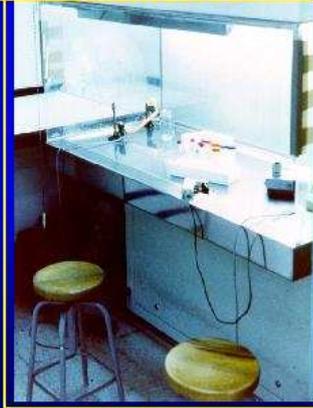


Fig.8.: Material empleado para el cultivo de linfocitos con bloqueo citocinético.

Material y método

Realización de un frotis del cultivo de linfocitos con bloqueo citocinético

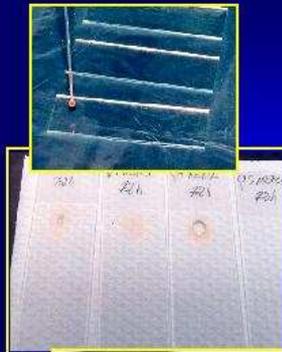
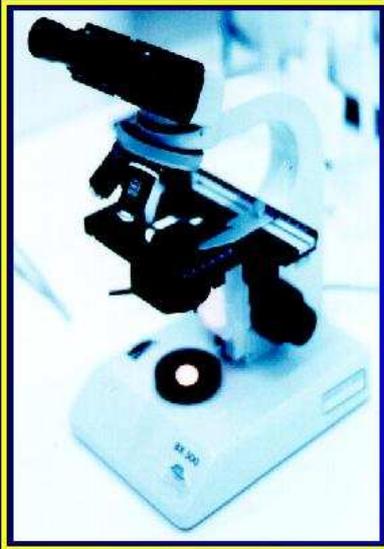


Fig.9.: Obtención de los frotis correspondientes a cada cultivo de linfocitos con BC.

Material y método



Determinar frecuencia de aparición de:
- MNCB/500 CB.

Fig.10.: Recuento de células (BC).

Material y método

Análisis morfométrico



Fig.11.: Material empleado para la realización de la morfometría.



Material y método

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

- Análisis de varianza.
- Análisis de residuos t de Student



PARAMETROS:

Factor de Protección
Dosis Equivalente Corporal Total

Fig.12.: Análisis estadístico.

CAPITULO V.-RESULTADOS

RESULTADOS FUNCIONALES

RESULTADOS MORFOLÓGICOS

V. RESULTADOS

V.1. DETERMINACIONES DE LAS CURVAS DOSIS RESPUESTAS

V.1.1 Inducción de micronúcleos por rayos X. Irradiación “in vitro”.

Se han utilizado las muestras sanguíneas de 9 pacientes de edades comprendidas entre 41 y 75 años, con una edad media de 60 años. Los pacientes eran de ambos sexos con un predominio del sexo masculino (8/9; 88.88%) sobre el femenino (1/9; 11.11%) (ver TABLA I).

Respecto a su hábito tabáquico, se obtuvo un predominio de los no fumadores (6/9; 66.66%) sobre los fumadores (3/9; 33.33%). Alguno de los no fumadores lo había sido pero había abandonado el hábito hace algunos años. (Ver TABLA I).

V.1.1.1 Determinación de las dosis de radiación

Las dosis de radiación empleadas oscilan entre 0,38 mGy como la dosis más baja y 334.83 mGy la dosis de rayos X más elevada (ver TABLA II).

V.1.1.2. Frecuencia de micronúcleos

Se aprecia un aumento progresivo del número de células con micronúcleos (positivas) conforme va aumentando la dosis de radiación administrada, observándose desde 4/500 CB células positivas a 0,38 mGy hasta 28/500 CB células positivas a 334,83 mGy de rayos X.

El número total de micronúcleos también presenta una relación directa con la dosis de rayos X recibida, variando desde 4 MN/500 CB a 0,38 mGy hasta 35 MN/500 CB a la dosis más elevada (334,83 mGy) (ver TABLA II).

En la GRAFICA I se puede observar la relación que mantiene la frecuencia de micronúcleos respecto a la dosis de radiación administrada.

V.1.1.3. Análisis estadístico

La relación entre el número total de micronúcleos y la dosis de radiación recibida es estadísticamente significativa, con un porcentaje de fiabilidad del 92,37% (el coeficiente de correlación lineal es $r = 0,9237$).

Los resultados obtenidos muestran una relación Lineal que puede expresarse mediante las siguientes expresiones matemáticas:

$$y = \alpha + \beta \cdot D$$

en donde:

y , es el número total de micronúcleos en 500 células CB

α y β son dos coeficientes de ajuste

D , es la dosis de radiación ionizante en mGy

obteniendo, por tanto, para nuestro estudio los valores siguientes de los coeficientes expresados: $\alpha = 5,885$ y $\beta = 0,075$; por lo que la expresión matemática en este estudio quedaría de la siguiente forma:

$$(n^{\circ})MN = 5,885 + 0,075 \cdot D$$

Por tanto, el análisis estadístico muestra una relación directamente proporcional entre la dosis de radiación y la frecuencia de aparición de micronúcleos. A mayor dosis de radiación, se observa un aumento proporcional en el número de micronúcleos.

La dosis de radiación, a su vez, podría obtenerse según la expresión:

$$D = \alpha + \beta \cdot y$$

que en este estudio quedaría expresada con los coeficientes $\alpha = -53,66$ y $\beta = 11,26$ y la expresión definitiva sería la siguiente:

$$D = -53,66 + 11,26 \cdot y$$

La representación gráfica de los valores reales obtenidos y los calculados con dicha ecuación se representan en las GRAFICAS I.

V.1.2. Inducción de micronúcleos por radiación gamma. Irradiación "in vitro".

Se han utilizado muestras sanguíneas de 2 pacientes varones de 56 y 61 años, supuestamente sanos, no fumadores y con una edad media de 58 años (ver TABLA III).

V.1.2.1. Determinación de las dosis de radiación

Las dosis de radiación determinadas por los dosímetros de termoluminiscencia varían desde 13 mGy como dosis más baja y 16362 mGy como dosis más alta (ver TABLA IV).

V.1.2.2. Frecuencia de micronúcleos

Se aprecia un aumento proporcional del número de células positivas, es decir, binucleadas con citoplasma conservado y presencia de micronúcleos, conforme aumenta la dosis de radiación. Varía desde 7/500 CB células positivas a la dosis más baja (13 mGy) hasta 184/500 CB células positivas con la dosis más elevada (16362 mGy) de rayos gamma.

Se observa la misma tendencia con respecto al número total de micronúcleos. Conforme aumenta la dosis de radiación, aumenta el número total de micronúcleos. Varía desde 7 MN/500 CB con la dosis de 13 mGy hasta 266 MN/500 CB a 16362 mGy.

Igualmente, la presencia de células positivas con 2 micronúcleos aumenta conforme se eleva la dosis de radiación. Se puede observar una célula positiva con 2 micronúcleos a la dosis de 104 mGy hasta 61 células positivas con 2 micronúcleos a la dosis de radiación gamma más elevada (16362 mGy) (ver TABLA IV).

V.1.2.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico muestra una relación de dependencia entre el número total de micronúcleos y las dosis de radiación gamma recibidas, presentando significación estadística. El coeficiente de correlación Lineal es $r = 0,9974$ por lo que la fiabilidad es del 99,74%.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto una relación Lineal que puede expresarse por la ecuación Lineal correspondiente cuya expresión sería:

$$y = \alpha + \beta \cdot D$$

en donde:

y , es el número total de micronúcleos, en 500 células CB.

α y β son coeficientes de ajuste.

D , es la dosis de radiación gamma en mGy.

Los valores obtenidos en este estudio son $\alpha = 6,891$ y $\beta = 0,015$, por lo que la expresión quedaría de la siguiente forma:

$$(n^\circ)MN = 6,891 + 0,015 \cdot D$$

La dosis de radiación esperada para un determinado número de micronúcleos podría calcularse a su vez por la siguiente expresión matemática:

$$D = \alpha + \beta \cdot y$$

Que en este caso tendría como coeficientes $\alpha = -429,54$ y $\beta = 64,37$; resultando:

$$D = -429,54 + 64,37 \cdot y$$

Se aprecia una relación directamente proporcional entre el número de micronúcleos y la dosis de radiación recibida. A mayor dosis de radiación se observa un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de aparición de micronúcleos.

La representación gráfica de los valores reales obtenidos y los valores esperados en función de la ecuación anterior se muestran en las GRAFICAS II.

En la GRAFICA II se pone de manifiesto la relación que mantiene la aparición de micronúcleos con la dosis de radiación gamma administrada.

V.1.3. Inducción de MN en linfocitos humanos: administración de sustancias antioxidantes antes de la exposición a radiación (GRUPO PREIRRADIACIÓN).

En este grupo se han obtenido los siguientes resultados:

V.1.3.1. MUESTRAS CONTROLES.

En las muestras de sangre controles no irradiadas observamos 29 células positivas/2500 CB, de las cuales 28 cuentan con 1 MN y sólo 1 presenta 2 MN. La frecuencia de aparición de MN oscila entre 5 y 7 MN/500 CB, con una media de 6.2 MN/500 CB. Dicho valor corresponde a la frecuencia de base o frecuencia de aparición espontánea de MN en linfocitos humanos (ver Tabla V; Gráficas III y V).

Las muestras controles irradiadas con 206 cGy presentan un incremento en el número de células positivas, siendo un total de 140 células

positivas/2500 CB de las cuales 133 van a presentar 1 MN, 5 células van a contar con 2 MN cada una y 2 células con 3 MN. Se ha detectado a su vez un aumento en la frecuencia de aparición de micronúcleos que oscila entre 26.2 y 31.5 MN/500 CB como valores mínimo y máximo respectivamente. La media de aparición de micronúcleos es de 29.4 MN/500 CB (ver Tabla VI; Gráficas IV, V y VI).

El análisis estadístico pone de manifiesto **diferencias significativas** entre las muestras de sangre irradiadas y no irradiadas, pudiendo establecerse que la radiación ionizante utilizada produce un incremento significativo en la aparición de micronúcleos en los linfocitos humanos estimulados a dividirse y bloqueados con Cyt B (**p<0.001**) (ver Gráficas IV, V, VI, XI y XII).

V.1.3.2. MUESTRAS TRATADAS CON DMSO.

En las muestras tratadas con DMSO no irradiadas observamos la presencia de 17 células positivas/ 1500 CB de las cuales 13 van a presentar 1 MN, 3 tienen 2 MN cada una y sólo 1 célula va a contar con 3 MN. La presencia de MN varía de 6 a 8.5 MN/ 500 CB con una media de 7.5 MN/500 CB (ver Tabla V; Gráficas III, V y VI).

En las muestras tratadas con DMSO e irradiadas posteriormente con 206 cGy de radiación gamma se observa un incremento en el número de células positivas y de MN. Observamos 147 células positivas/2500 CB, de las cuales 141 presentan 1 MN y 6 de esas células presentan 2 MN cada una. La frecuencia de MN oscila entre 27.5 y 34 con una media de 30.7 MN/ 500 CB (ver Tabla VI; Gráficas IV, V, VI y VIII).

El análisis estadístico ha puesto de manifiesto **diferencias significativas** entre las muestras de sangre irradiadas y no irradiadas tratadas con DMSO, pudiendo establecerse que la radiación ionizante utilizada produce un incremento significativo en la aparición de micronúcleos en los linfocitos

humanos estimulados a dividirse y bloqueados con Cyt B ($p < 0.001$) (ver Gráficas IV, V, VI, VIII, XI y XII).

V.1.3.3. MUESTRAS TRATADAS CON RUTINA.

En las muestras tratadas con rutina no irradiadas observamos la presencia de 16 células positivas/ 1500 CB de las cuales 2 van a presentar 2 MN cada una. La frecuencia de aparición de micronúcleos varía de 5 a 7 MN/ 500 CB con una media de 6 MN/500 CB (ver Tabla V; Gráficas III, V y VI).

Las muestras tratadas con rutina e irradiadas posteriormente con 206 cGy, presentan 42 células positivas/1000 CB, de las cuales 40 cuentan con 1 MN y 2 células con 2 MN cada una. La frecuencia de aparición de MN es de 15.5 y 29 MN/ 500 CB. La media de aparición de micronúcleos es de 22.25 MN/ 500 CB (ver Tabla VI; Gráficas IV, V, VI y VIII).

El análisis estadístico ha puesto de manifiesto **diferencias significativas** entre las muestras de sangre irradiadas y no irradiadas tratadas con rutina, pudiendo establecerse que la radiación ionizante utilizada produce un incremento significativo en la aparición de micronúcleos en los linfocitos humanos estimulados a dividirse y bloqueados con Cyt B ($p < 0.001$) (ver Gráficas III, IV, V, VI, XI y XII).

V.1.3.4. MUESTRAS TRATADAS CON DIOSMINA.

En las muestras tratadas con diosmina no irradiadas observamos la presencia de 16 células positivas/ 1500 CB de las cuales 14 van a presentar 1 MN y 2 células van a contar con 2 MN cada una. La frecuencia de aparición de micronúcleos oscila entre 4 y 8 MN/ 500 CB, con una media de 6 MN/ 500 CB (ver Tabla V; Gráficas III, V y VI).

Las muestras tratadas con diosmina e irradiadas posteriormente con 206 cGy, presentan 26 células positivas/1000 CB que cuentan con 1 MN cada una. La frecuencia de aparición de MN es de 15.5 y 9 MN/ 500 CB. La media de aparición de micronúcleos es de 13.25 MN/ 500 CB (ver Tabla VI; Gráficas IV, V, VI y VIII).

El análisis estadístico ha puesto de manifiesto **diferencias significativas** entre las muestras de sangre irradiadas y no irradiadas tratadas con diosmina, pudiendo establecerse que la radiación ionizante utilizada produce un incremento significativo en la aparición de micronúcleos en los linfocitos humanos estimulados a dividirse y bloqueados con Cyt B (**p<0.001**) (ver Gráficas III, IV, V, VI, XI y XII).

V.1.3.5. MUESTRAS TRATADAS CON P90.

En las muestras tratadas con P90 no irradiadas observamos la presencia de 12 células positivas/ 1500 CB de las cuales 9 van a presentar 1 MN, 2 células van a contar con 2 MN cada una y 1 célula cuenta con 3 MN. La frecuencia de MN observada oscila entre 4 y 7.5 MN/ 500 CB, con una media resultante de 5.5 MN/ 500 CB (ver Tabla V; Gráficas III, V y VI).

Las muestras tratadas con P90 e irradiadas posteriormente con 206 cGy, presentan 57 células positivas/2500 CB de las cuales 53 tienen 1 MN, 3 células tienen 2 MN y 1 célula va a contar con 3 MN. La frecuencia de aparición de MN oscila entre 8 y 25 MN/500 CB con una media de 12.4 MN/500 CB (ver Tabla VI; Gráficas IV, V, VI y VIII).

El análisis estadístico ha puesto de manifiesto **diferencias significativas** entre las muestras de sangre irradiadas y no irradiadas tratadas con P90, pudiendo establecerse que la radiación ionizante utilizada produce un incremento significativo en la aparición de micronúcleos en los linfocitos humanos estimulados a dividirse y bloqueados con Cyt B (**p<0.01**) (ver Gráficas III, IV, V, VI, XI y XII).

V.1.3.6. MUESTRAS TRATADAS CON VITAMINA C.

En las muestras tratadas con vitamina C no irradiadas se observa la presencia de 14 células positivas/ 1500 CB de las cuales 11 van a presentar 1 MN y 3 células van a contar con 2 MN. La frecuencia de aparición de MN oscila entre 4.5 y 7 MN/ 500 CB como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media de 6 MN/ 500 CB (ver Tabla V; Gráficas III, V y VI).

Las muestras tratadas con vitamina C e irradiadas posteriormente, presentan 31 células positivas/1000 CB de las cuales 29 cuentan con 1 MN cada una y 2 células con 2 MN. La frecuencia de aparición de MN es de 12 y 21 MN/ 500 CB con un valor medio de 16.5 MN/ 500 CB (ver Tabla VI; Gráfica IV, V, VI y VIII).

El análisis estadístico ha puesto de manifiesto **diferencias significativas** entre las muestras de sangre irradiadas y no irradiadas tratadas con vitamina C, pudiendo establecerse que la radiación ionizante utilizada produce un incremento significativo en la aparición de micronúcleos en los linfocitos humanos estimulados a dividirse y bloqueados con Cyt B (**p<0.01**) (ver Gráficas III, IV, V, VI, XI y XII).

V.1.3.7. FACTOR DE PROTECCIÓN (FP)

El factor de protección más elevado se ha obtenido con P90 con un valor del 57%, a continuación tenemos diosmina con un FP del 54% y vitamina C con un FP del 44%. El FP más bajo corresponde a rutina y es igual al 24%.

Con DMSO no se ha obtenido ninguna reducción de dosis, lo cual sugiere que no muestran un efecto protector frente a la dosis de radiación administrada (ver Tabla VII; Gráfica X).

V.1.3.8 RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADÍSTICO.

1. Las muestras de sangre controles irradiadas presentan un **incremento significativo** de MN respecto de las muestras controles no irradiadas ($p<0.001$). Esto significa que la radiación ionizante administrada produce un incremento significativo en la frecuencia de aparición de MN (ver Gráficas XI y XII).
2. El tratamiento administrado a las muestras de sangre no irradiadas (diosmina, rutina, P90, DMSO y vitamina C), **no presenta diferencias significativas** respecto de las muestras controles no irradiadas, lo cual significa que la administración de las diferentes sustancias no produce lesión cromosómica respecto de las muestras controles (ver Gráficas XI y XII).
3. Las muestras de sangre irradiadas tratadas antes de la irradiación con diosmina, P90 y vitamina C, muestran una **disminución significativa** en la frecuencia de aparición de micronúcleos respecto de las muestras controles irradiadas ($p<0.001$). Esto significa que los tratamientos realizados disminuyen la frecuencia de MN esperados como consecuencia de la irradiación y suponen por tanto, una protección frente al daño cromosómico inducido por la radiación ionizante (ver Gráficas XI y XII).
4. Las muestras de sangre irradiadas tratadas antes de la irradiación con rutina, muestran **una disminución significativa** en la frecuencia de aparición de micronúcleos respecto de las muestras controles irradiadas ($p<0,05$). Esto significa que el tratamiento realizado disminuye la frecuencia de MN esperados como consecuencia de la irradiación y supone por tanto, una protección frente al daño cromosómico inducido por la radiación ionizante (ver Gráficas XI y XII).
5. Las muestras de sangre irradiadas tratadas antes de la irradiación con DMSO, **no muestran una disminución significativa** en la frecuencia de

aparición de micronúcleos respecto a las muestras controles irradiadas. Esto significa que la irradiación realizada no produce modificaciones significativas en la aparición de MN si las muestras de sangre son previamente tratadas con estas sustancias (ver Gráficas XI y XII).

V.1.4 Inducción de MN en linfocitos humanos: administración de sustancias antioxidantes tras la exposición a radiación (GRUPO POSTIRRADIACIÓN).

Los resultados obtenidos en este grupo han sido los siguientes

V.1.4.1. MUESTRAS TRATADAS CON DMSO.

En las muestras tratadas con DMSO no irradiadas se observa la presencia de 17 células positivas/ 1500 CB de las cuales 13 van a presentar 1 MN, 3 tienen 2 MN cada una y sólo 1 célula va a contar con 3 MN. La presencia de MN varía de 6 a 8.5 MN/ 500 CB con una media de 7.5 MN/500 CB (ver Tabla V; Gráficas III, VI y VII).

Las muestras irradiadas con 206 cGy y tratadas posteriormente con DMSO, presentan 60 células positivas/1000 CB de las cuales 58 cuentan con 1 MN cada una y 1 célula cuenta con 2 MN. La frecuencia de aparición de MN es de 29 y 32 MN/ 500 CB con un valor medio de 30.5 MN/ 500 CB (ver Tabla VIII; Gráficas VI, VII, VIII y IX).

El análisis estadístico ha puesto de manifiesto **diferencias significativas** entre las muestras de sangre tratadas con DMSO no irradiadas e irradiadas antes de ser tratadas, pudiendo establecerse que la radiación ionizante utilizada produce un incremento significativo en la aparición de micronúcleos en los linfocitos humanos estimulados a dividirse y bloqueados con Cyt B (**p<0.001**) (ver Gráficas VI, VII, VIII, IX, XI, XIII).

V.1.4.2. MUESTRAS TRATADAS CON RUTINA.

En las muestras tratadas con rutina no irradiadas se observa la presencia de 16 células positivas/ 1500 CB de las cuales 2 van a presentar 2 MN cada una. La frecuencia de aparición de micronúcleos varía de 5 a 7 MN/ 500 CB con una media de 6 MN/500 CB (ver Tabla V; Gráficas III,VI y VII).

Las muestras irradiadas con 206 cGy y tratadas posteriormente con rutina, presentan 45 células positivas/1000 CB de las cuales 42 tienen 1 MN y 3 células cuentan con 2 MN cada una. La frecuencia de aparición de MN es de 23 y 25 MN/ 500 CB con un valor medio de 24 MN/ 500 CB (ver Tabla VIII; Gráficas VI, VII, VIII, IX).

El análisis estadístico ha puesto de manifiesto **diferencias significativas** entre las muestras de sangre tratadas con rutina no irradiadas e irradiadas antes de ser tratadas, pudiendo establecerse que la radiación ionizante utilizada produce un incremento significativo en la aparición de micronúcleos en los linfocitos humanos estimulados a dividirse y bloqueados con Cyt B (**p<0.001**) (ver Gráficas VI, VII, VIII, IX, XI, XIII).

V.1.4.3. MUESTRAS TRATADAS CON DIOSMINA.

En las muestras tratadas con diosmina no irradiadas se observa la presencia de 16 células positivas/ 1500 CB de las cuales 14 van a presentar 1 MN y 2 células van a contar con 2 MN cada una. La frecuencia de aparición de micronúcleos oscila entre 4 y 8 MN/ 500 CB, con una media de 6 MN/ 500 CB (ver Tabla V; Gráficas III, VI, VII).

Las muestras irradiadas con 206 cGy y tratadas posteriormente con diosmina, presentan 39 células positivas/1000 CB de las cuales 38 cuentan con 1 MN cada una y 1 célula cuenta con 2 MN. La frecuencia de aparición de MN es de 18 y 22 MN/ 500 CB con un valor medio de 20 MN/ 500 CB (ver Tabla VIII; Gráficas VI, VII, VIII, IX).

El análisis estadístico ha puesto de manifiesto **diferencias significativas** entre las muestras de sangre tratadas con diosmina no irradiadas e irradiadas antes de ser tratadas, pudiendo establecerse que la radiación ionizante utilizada produce un incremento significativo en la aparición de micronúcleos en los linfocitos humanos estimulados a dividirse y bloqueados con Cyt B (**p<0.001**) (ver Gráficas VI, VII, VIII, IX, XI, XIII).

V.1.4.4. MUESTRAS TRATADAS CON P90.

En las muestras tratadas con P90 no irradiadas se observa la presencia de 12 células positivas/ 1500 CB de las cuales 9 van a presentar 1 MN, 2 células van a contar con 2 MN cada una y 1 célula cuenta con 3 MN. La frecuencia de MN observada oscila entre 4 y 7.5 MN/ 500 CB, con una media resultante de 5.5 MN/ 500 CB (ver Tabla V; Gráficas III, VI, VII).

Las muestras irradiadas con 206 cGy y tratadas posteriormente con P90, presentan 62 células positivas/2000 CB de las cuales 59 cuentan con 1 MN, 2 células con 2 MN y 1 célula cuenta con 3 MN. La frecuencia de aparición de MN oscila de 10 a 22 MN/ 500 CB con un valor medio de 16.5 MN/ 500 CB (ver Tabla VIII; Gráficas VI, VII, VIII, y IX).

El análisis estadístico ha puesto de manifiesto **diferencias significativas** entre las muestras de sangre tratadas con P90 no irradiadas e irradiadas antes de ser tratadas, pudiendo establecerse que la radiación ionizante utilizada produce un incremento significativo en la aparición de micronúcleos en los linfocitos humanos estimulados a dividirse y bloqueados con Cyt B (**p<0.01**) (ver Gráficas VI, VII, VIII, IX, XI, XIII).

V.1.4.5. MUESTRAS TRATADAS CON VITAMINA C.

En las muestras tratadas con vitamina C no irradiadas se observa la presencia de 14 células positivas/ 1500 CB de las cuales 11 van a presentar

1 MN y 3 células van a contar con 2 MN. La frecuencia de aparición de MN oscila entre 4.5 y 7 MN/ 500 CB como valores mínimo y máximo respectivamente, con una media de 6 MN/ 500 CB (ver Tabla V; Gráficas III, VI y VII).

Las muestras irradiadas con 206 cGy y tratadas posteriormente con vitamina C, presentan 39 células positivas/1000 CB de las cuales 37 cuentan con 1 MN cada una y 2 células cuentan con 2 MN. La frecuencia de aparición de MN es de 18.5 y 23.5 MN/ 500 CB, siendo la media de MN observados igual a 21 MN/500 CB (ver Tabla VIII; Gráficas VI, VII, VIII, y IX).

El análisis estadístico ha puesto de manifiesto **diferencias significativas** entre las muestras de sangre tratadas con vitamina C no irradiadas e irradiadas antes de ser tratadas, pudiendo establecerse que la radiación ionizante utilizada produce un incremento significativo en la aparición de micronúcleos en los linfocitos humanos estimulados a dividirse y bloqueados con Cyt B (**p<0.001**) (ver Gráficas VI, VII, VIII, IX, XI, XIII).

V.1.4.6. FACTOR DE PROTECCIÓN (FP).

El factor de protección más elevado al administrar las sustancias tras ser irradiadas se ha obtenido con P90 y es del 43%; seguido de diosmina con un FP del 32%, vitamina C con un valor del 28% y el FP más bajo es del 18% con rutina. El DMSO no presenta factor de protección lo que puede interpretarse como que no parece tener efecto protector frente a la dosis de radiación administrada (ver Tabla VII; Gráfica X).

V.1.4.7. RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADÍSTICO.

1. Las muestras de sangre irradiadas tratadas después de la irradiación con P90 muestran **una disminución significativa** en la frecuencia de aparición de micronúcleos respecto a las muestras controles irradiadas (**p<0,001**).

Esto significa que el tratamiento con P90 disminuye la frecuencia de MN esperados como consecuencia de la irradiación; puede interpretarse como un efecto protector de dicha sustancia frente al daño cromosómico inducido por radiación ionizante (ver Gráficas XI y XIII).

2. Las muestras de sangre irradiadas y tratadas después de la irradiación con diosmina y vitamina C muestran **una disminución significativa** en la frecuencia de aparición de micronúcleos respecto a las muestras controles irradiadas ($p < 0,05$). Esto significa que los tratamientos realizados disminuyen la frecuencia de MN esperados como consecuencia de la irradiación; puede interpretarse como un efecto protector de dichas sustancias frente al daño cromosómico inducido por radiación ionizante (ver Gráficas XI y XIII).
3. Las muestras de sangre irradiadas y tratadas después de la irradiación con DMSO, y rutina, **no muestran una disminución significativa** en la frecuencia de aparición de micronúcleos respecto a las muestras controles irradiadas. Esto significa que la irradiación realizada no produce modificaciones significativas en la aparición de MN si las muestras de sangre son tratadas posteriormente con estas sustancias y que por tanto carecen de capacidad protectora frente al daño cromosómico inducido por la radiación (ver Gráficas XI y XIII).

V.2. INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN PACIENTES IRRADIADOS EN EXPLORACIONES DE RADIODIAGNÓSTICO MÉDICO.

Se han obtenido diferentes muestras sanguíneas de 25 pacientes en edades comprendidas entre 21 y 84 años, con una edad media de 56 años. Los pacientes son de ambos sexos con predominio del sexo masculino (22/25; 88%) sobre el femenino (3/25; 12%) (ver TABLA IX).

Las exploraciones radiológicas a las que se sometieron los pacientes cuyas muestras sanguíneas se han estudiado son fundamentalmente coronariografías, arteriografías y urografías (ver TABLA X).

Respecto a su hábito tabáquico, se obtuvo un ligero predominio de los no fumadores (13/25; 52%) sobre los fumadores (12/25; 48%). Alguno de los no fumadores había fumado previamente, pero había abandonado el hábito hace algunos años (ver TABLA IX).

V.2.1. Muestra de sangre extraída antes de la exploración radiológica,(muestra control no irradiada).

El número total de linfocitos binucleados con presencia de micronúcleos fue de 167, variando desde 2 células positivas hasta 21 células positivas. Dado que esta toma es la de control o frecuencia basal en todos los individuos, se puede considerar su valor medio como el valor de base, o frecuencia espontánea encontrada en nuestros pacientes. Aparece pues, una media de 6,68 células positivas por 500 células binucleadas bloqueadas con citoplasma conservado (ver TABLA XI).

Con respecto al número total de micronúcleos, este fue de 177, oscilando entre 2 MN/500 y 23 MN/500 CB. El promedio del número total de micronúcleos se establece en 7,08 MN/ 500 células bloqueadas (ver TABLA XI).

V.2.2. Muestra de sangre no irradiada con contraste radiológico al 5%.

El número de células positivas (52/500 CB), presenta una variabilidad desde 2 células positivas en diversos pacientes hasta 6 células positivas tras conocer valores. Su media se sitúa en $3,47 \pm 0,35$ células

positivas sobre 500 células bloqueadas con citoplasma preservado (ver TABLA XII).

El número total de micronúcleos es de 52, oscila entre 2 MN/500 CB en distintos pacientes y 6 MN/500 CB como valores. Con un promedio de $3,47 \pm 0,35$ micronúcleos por 500 células binucleadas (ver TABLA XII).

V.2.3. Muestra de sangre irradiada “in vitro” sin contraste

V.2.3.1. Determinación de las dosis de radiación

Se observa una variabilidad entre 0,38 mGy en el paciente 2 como la dosis más baja y 17,32 mGy en el paciente 3 como la dosis de radiación más elevada a la que se expusieron los pacientes. La suma total de todas las dosis administradas a los pacientes fue de 67,83 mGy (ver TABLA XIII).

V.2.3.2. Frecuencia de micronúcleos

Se observaron un número total de 113 micronúcleos. Oscilaron entre 3 MN/500 CB como cifra más baja y 21 MN/500 CB, como la más elevada.

El número total de células positivas fue de 98, con una variabilidad que oscila entre 3 células positivas/500 CB y, 15 células positivas/500 CB, obteniéndose una media de $6,53 \pm 0,77$ células positivas/500 CB. Así mismo, se apreciaron 10 células positivas con dos micronúcleos y una con 4 micronúcleos (ver TABLA XIII). La media de micronúcleos obtenida es de $7,53 \pm 1,12$ MN/500 CB.

V.2.4. Muestra de sangre extraída al paciente al finalizar la exploración radiológica(muestra irradiada “in vivo”).

V.2.4.1. Determinación de las dosis de radiación

La dosis de radiación no es constante porque depende de las exploraciones radiológicas realizadas; esta dosis oscila entre 0,38 mGy en el paciente nº2 como la dosis más baja y 17,32 mGy en el paciente nº3 como la dosis de radiación más elevada a la que se expusieron los pacientes (ver TABLA XIV).

V.2.4.2. Frecuencia de micronúcleos.

El número total de células positivas fue de 184, con una oscilación entre 2 células positivas/500 CB en el paciente nº 6 y 16 células positivas/500 CB en el paciente nº 21, obteniéndose una media de 7,36 células positivas/500 CB. Se observaron 21 células binucleadas con 2 micronúcleos y 3 células binucleadas con 3 micronúcleos (ver TABLA XIV).

La frecuencia media obtenida en las muestras no irradiadas (muestras I y II) es de 3,45 MN/500 CB; mientras que la media obtenida en las muestras irradiadas (muestras III y IV) ha sido de 6,9 MN/500 CB.

V.3. INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN PACIENTES IRRADIADOS EN EXPLORACIONES DIAGNÓSTICAS DE MEDICINA NUCLEAR.

Se han obtenido diferentes muestras sanguíneas de 26 pacientes en edades comprendidas entre 27 y 89 años, con una edad media de 53.5 años. Los pacientes son de ambos sexos con predominio del sexo femenino (19/26; 73%) sobre el masculino (7/26; 26%) (ver TABLA XV).

Las exploraciones diagnósticas a las que se sometieron los pacientes cuyas muestras sanguíneas se han estudiado son fundamentalmente gammagrafía paratiroidea, gammagrafía mamaria y gammagrafía osea utilizando en todas ellas una dosis de radiofarmaco de 740 Mbq de ^{99m}Tc (ver TABLA XVI).

De cada paciente se han obtenido 2 muestras sanguíneas diferentes, correspondiéndose con 2 momentos diferentes de la exploración gammagráfica:

Muestra o tubo 1: Previa al inicio de la exploración gammagráfica. Se considera como control o frecuencia basal de cada paciente.

Muestra o tubo 2: Se obtiene directamente del paciente cuando se ha finalizado la exploración gammagráfica. Por tanto, la muestra sanguínea contiene linfocitos irradiados que han estado en sangre circulante y en contacto "in vivo" con el isótopo radiactivo que se ha administrado durante la exploración.

V.3.1. Muestra de sangre extraída antes de la exploración gammagráfica,(muestra no irradiada).

El número total de linfocitos binucleados con presencia de micronúcleos fue de 120, variando desde 2 células positivas hasta 8 células positivas como valores mínimos y máximos respectivamente. Dado que esta toma es la de control o frecuencia basal en todos los individuos, se puede considerar su valor medio como el valor de base, o frecuencia espontánea encontrada en nuestros pacientes. Aparece pues, una media de 4.62 células positivas por 500 células binucleadas bloqueadas con citoplasma conservado (ver TABLA XVII).

V.3.2. Muestra de sangre extraída al paciente al finalizar la exploración radiológica,(muestra irradiada).

El número total de células positivas fue de 118, con una oscilación entre 2 células positivas/500 CB y 10 células positivas/500 CB, obteniéndose una media de 4.54 células positivas/500 CB como valores máximo y mínimo respectivamente (ver TABLA XVIII).

V.4. INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN PACIENTES IRRADIADOS EN ACTIVIDADES TERAPÉUTICAS EN MEDICINA NUCLEAR.

Se han obtenido diferentes muestras sanguíneas de 25 pacientes en edades comprendidas entre 11 y 67 años, con una edad media de 43 años. Los pacientes son de ambos sexos con predominio del sexo femenino (21/25; 84%) sobre el masculino (4/25; 16%) (ver TABLA XIX).

Los tipos de cancer de tiroides que fueron tratados con I^{131} fueron cancer papilar en 16 pacientes, cancer folicular en 6 pacientes, cancer mixto en 1 paciente y cancer medular en 2 pacientes recibiendo todos ellos una dosis ablativa de restos quirúrgicos de 100 mCi de I^{131} excepto en un grupo reducido de pacientes que recibieron una dosis ablativa superior por indicación de su enfermedad (ver TABLA XX).

Seis pacientes habian recibido dosis previa de I^{131} para el tratamiento de su enfermedad presentando el paciente nº6 una dosis acumulada de 450 mCi por enfermedad diseminada, el paciente n 11 100 mCi, el paciente nº12 150 mCi, el paciente nº14 300 mCi, y el paciente nº 15 100 mCi.

De cada paciente se han obtenido 2 muestras sanguíneas diferentes, correspondiéndose con 2 momentos diferentes:

Muestra o tubo 1: Previa al inicio del tratamiento ablativo. Se considera como control o frecuencia basal de cada paciente.

Muestra o tubo 2: Se obtiene directamente del paciente entre las 48-72 de la administración de la dosis, momento en que el paciente se encuentra por debajo de los límites legales de radioprotección para su alta hospitalaria. Por tanto, la muestra sanguínea contiene linfocitos irradiados que han estado en sangre circulante y en contacto "in vivo" con el isótopo radiactivo que se ha administrado durante la exploración.

V.4.1. Muestra de sangre extraída antes del tratamiento ablativo,(muestra no irradiada).

El número total de linfocitos binucleados con presencia de micronúcleos fue de 102, variando desde 2 células positivas, hasta 7 células positivas como valores mínimos y máximos respectivamente. Dado que esta toma es la de control o frecuencia basal en todos los individuos, se puede considerar su valor medio como el valor de base, o frecuencia espontánea encontrada en nuestros pacientes. Aparece pues, una media de 4'08 células positivas por 500 células binucleadas bloqueadas con citoplasma conservado (ver TABLA XXI).

V.4.2. Muestra de sangre extraída al paciente en el momento de su alta,(muestra irradiada).

El número total de células positivas fue de 220, con una oscilación entre 4 células positivas/500 CB y 13 células positivas/500 CB como valores mínimos y máximos respectivamente, obteniéndose una media de 8.80 células positivas/500 CB (ver TABLA XXII).

V.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

V.5.1. Pacientes irradiados en exploraciones de radiodiagnóstico médico.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos pone de manifiesto las siguientes correlaciones:

1. Correlación muestra I/ Muestra II

No se aprecia relación de dependencia significativa entre el número total de micronúcleos en linfocitos de pacientes no irradiados y el número total de micronúcleos de linfocitos de sangre no irradiada, pero mezclada con contraste radiológico al 5%(HEXABRIX®).

En definitiva, el contraste hidrosoluble e iónico utilizado no supone modificación estadísticamente significativa en la frecuencia de aparición de micronúcleos en las muestras analizadas (ver tabla XXIII).

2. Correlación Muestra I/ Muestra III

La relación entre el número total de micronúcleos en la muestra I (previo a la exploración) y muestra III (muestra permanentemente expuesta bajo el haz de rayos X) presenta una significación estadísticamente significativa ($p=0.0028$).

El único factor diferencial entre ambas muestras es la dosis de radiación absorbida. Por ello, puede decirse que la radiación absorbida por la exposición a la exploración radiológica, provoca el aumento estadísticamente significativo del número de micronúcleos de los linfocitos analizados con esta técnica (ver tabla XXIII).

3. Correlación Muestra I/ Muestra IV

La relación entre el número total de micronúcleos en la muestra I (previo a la exploración) y muestra IV (muestra obtenida del paciente terminada

dicha exploración) presenta una significación estadísticamente significativa ($p=0.0186$).

Dado que ambas muestras se obtienen directamente del paciente antes y después de la exploración radiológica, los únicos factores diferenciales son la dosis de radiación administrada y el contraste radiológico utilizado. Por ello, podría decirse que la dosis de radiación administrada “in vivo” durante la exploración radiológica produce un aumento significativo del número de micronúcleos en los linfocitos estudiados y con la técnica empleada (ver tabla XXIII).

4. Correlación Muestra II/ Muestra III

Se observa una correlación estadísticamente significativa entre el número total de micronúcleos de la muestra II (no irradiado, pero con contraste “in vitro”) y muestra III (expuesta “in vitro” permanentemente bajo el haz primario de rayos X) ($p=0.0003$) (ver tabla XXIII).

Es decir, la dosis de radiación administrada “in vitro” durante la exploración radiológica produce un aumento estadísticamente significativo del número de micrónucleos respecto de la sangre no irradiada y mezclada “in vitro” con contraste radiológico.

5. Correlación Muestra II/ Muestra IV

Se observa una correlación estadísticamente significativa entre el número total de micronúcleos de la muestra II (no irradiado, pero con contraste “in vitro”) y muestra IV (extraída del paciente al finalizar la exploración radiológica) ($p=0.0028$) (ver tabla XXIII).

Dado que las muestras II y IV contienen contraste radiológico, el factor diferencial entre ambas muestras es la dosis de radiación administrada. Por ello, podría decirse que la dosis de radiación administrada durante la

exploración radiológica produce un aumento estadísticamente significativo del número de micronúcleos en los linfocitos estudiados (ver tabla XXIII).

6. Correlación Muestra III/ Muestra IV

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el número total de micrónucleos en la muestra III (permanentemente expuesta al haz de rayos X) y la muestra IV (extraída del paciente al finalizar la exploración) ($p=0.4827$) (ver tabla XXIII).

Ello muestra que no se aprecian diferencias significativas entre la dosis de radiación administrada a ambas muestras: “in vivo” e “in vitro”.

7. Correlación Muestra III/ dosis de radiación

No se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre el número total de micronúcleos de la muestra III (permanentemente expuesta bajo el haz primario de rayos X) y las dosis de radiación absorbida, determinadas por cristales de termoluminiscencia.

Se podría decir, por tanto, que las diferentes dosis de radiación administradas “in vitro” durante la exploración radiológica no suponen una modificación significativa del número total de micronúcleos encontrados en los linfocitos estudiados entre los pacientes irradiados.

8. Correlación Muestra IV/ dosis de radiación

La relación, entre el número total de micronúcleos en la muestra IV (extraída del paciente al finalizar la exploración) y la dosis de radiación administradas durante la exploración, no muestra diferencias estadísticamente significativas.

Es decir, las dosis de rayos X administradas “in vivo” durante la exploración radiológica, no tienen un efecto estadísticamente significativo

en la modificación del número total de micronúcleos en los cultivos estudiados en los pacientes irradiados.

Por último las muestras irradiadas (III y IV) presentan diferencias significativas respecto de la muestras no irradiadas (I y II)($p < 0.001$). Por lo que podría expresarse como que la exposición a radiación ionizante durante las exploraciones de radiodiagnóstico médico produce un aumento significativo en la frecuencia de aparición de micronúcleos en los pacientes irradiados.

No se observan diferencias significativas entre sí cuando se analizan las muestras no irradiadas (I con II), ni las muestras irradiadas (III con IV).

V.5.2. Pacientes irradiados en exploraciones diagnósticas de medicina nuclear.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en los pacientes irradiados en exploraciones diagnósticas de medicina nuclear pone de manifiesto las siguientes correlaciones:

1º.- Las diferencias obtenidas entre el número total de micronúcleos en la muestra 1 (muestra de sangre antes de la exposición radiológica) y muestra 2 (obtenida del paciente terminada dicha exploración) no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

2º.- Por ello, podría expresarse que las dosis de radiación utilizadas en estas exploraciones no produce el aumento significativo de micronúcleos en los pacientes irradiados(GRÁFICA XIV).

La edad y el sexo del paciente tampoco ha presentado diferencias significativas.

V.5.3. Pacientes irradiados en actividades terapéuticas en medicina nuclear.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en los pacientes irradiados en actividades terapéuticas en medicina nuclear muestra:

En 21 de los 25 pacientes estudiados se ha puesto de manifiesto un aumento de MN tras la administración de ^{131}I (85%:21/25), y en los que se aprecia significación estadística ($p < 0.01$) respecto de las muestras controles obtenidas antes de la irradiación.

Por lo que puede decirse que el tratamiento con ^{131}I en estos pacientes produce un incremento significativo de la frecuencia de micronúcleos en los mismos (GRÁFICA XV).

La frecuencia de MN tras el tratamiento con ^{131}I (4.08 MN/500 CB; 0.008 MN/CB) ha duplicado la frecuencia espontánea basal (8.8 MN/500CB; 0.0176 MN/CB).

La edad y el sexo de los pacientes no presentan diferencias significativas.

V.5.4. Dosis Equivalente corporal total (DECT).

La DECT determinada en este grupo de pacientes es de 45.4 mGy en su comparación con las frecuencias determinadas "in vitro" para radiación X y de 136.916 mGy en comparación con las frecuencias determinadas "in vitro" para radiación gamma.

V.6. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LOS MICRONÚCLEOS INDUCIDOS POR LA RADIACIÓN IONIZANTE.

V.6.1. Tamaño del micronúcleo inducido por radiación

La mayoría de los micronúcleos (88,2%) son menores de 8 micrómetros cuadrados. El tamaño máximo encontrado es de 19,488 micrómetros cuadrados y el mínimo de 0,853 micrómetros cuadrados. El mayor número de micronúcleos (86,6%; 134/150) se encuentran entre 2 y 6 micrómetros cuadrados de tamaño (GRAFICA XVI).

V.6.2. Tamaño y distribución del área nuclear de los linfocitos bloqueados con citochalasin B.

La morfometría se ha realizado sobre ambos núcleos de linfocitos que presentaban micronúcleos en su citoplasma conservado.

El 84,6% de los linfocitos estudiados (127/150), presentan entre 70-200 micras cuadradas de área nuclear. El valor máximo hallado fue de 413,54 micras cuadradas y el mínimo de 63,92 micras cuadradas (ver TABLA ; GRAFICA XXVII).

V.6.3. Relación entre el área del micronúcleo radioinducido y el área nuclear de linfocitos bloqueados con citocalasina B.

La mayoría de los micronúcleos estudiados (86,6%; 130/150) no superan el 8% del área nuclear de los linfocitos binucleados. El valor máximo hallado fue de 14,727% y el mínimo de 0,625% (, GRAFICA XVIII).

V.6.4. Relación entre el área del micronúcleo radioinducido y el área de los linfocitos bloqueados con citocalasina B.

El 86,1% de los micronúcleos estudiados (130/150) ocupan menos del 3% del área de los linfocitos binucleados con presencia de

micronúcleos. El valor máximo encontrado fue de 5,297% y el mínimo de 0,247%.

V.6.5. Distribución del tamaño de los linfocitos bloqueados con citochalcasina B.

El área del linfocito es muy variable, presentando un tamaño máximo de 1197,16 micras cuadradas y un área mínima de 148,28 micras cuadradas.

El 46,6% (70/150) se encuentra en el grupo cuya área linfocitaria es menor de 300 micras cuadradas, siendo entre 200 y 300 micras cuadradas donde se encuentra el número más elevado de linfocitos (49/150). Otros resultados significativos del análisis morfométrico, se podrían resumir de la siguiente forma:

1. El área media de los linfocitos estudiados es de 347,06 micras cuadradas.
2. El área nuclear media es de 143,97 micras cuadradas.
2. Normalmente los micronúcleos ocupan el 1,79% del área del linfocito.
3. Los micronúcleos presentan habitualmente un tamaño aproximado del 4,27% del área nuclear.
4. El área media del micronúcleo es de 4,86 micrómetros cuadrados.

Fig.1. : Imagen panorámica de un campo microscópico de frotis de cultivo de linfocitos con Bloqueo Citogenético (x 400). Obsérvense linfocitos bloqueados con dos núcleos en su interior y citoplasma conservado (CB), junto a linfocitos sin Bloqueo Citocinético y aspecto normal (L).

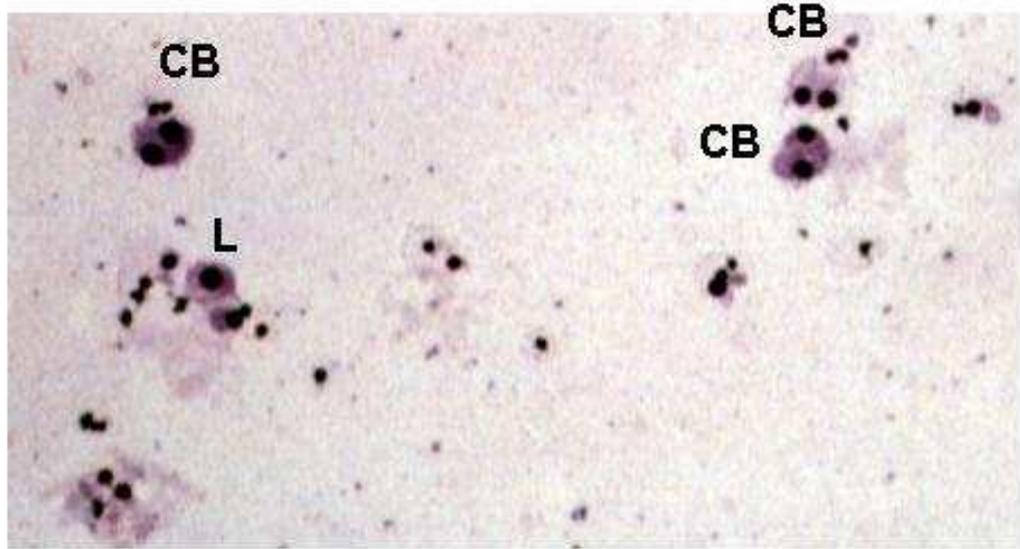


Figura 1.

Fig.2. : Detalle de los dos tipos celulares más abundantes: linfocito bloqueado con citochalasin B (CB) y linfocito normal (L) (x 400).

Fig.3. : Imagen de dos linfocitos bloqueados con citochalasin B: uno, sin micronúcleo (CB); otro con un micronúcleo en su citoplasma (MNCB) (x 400).

Fig.4. : Grupo de células; una de ellas presenta un micronúcleo en su interior.

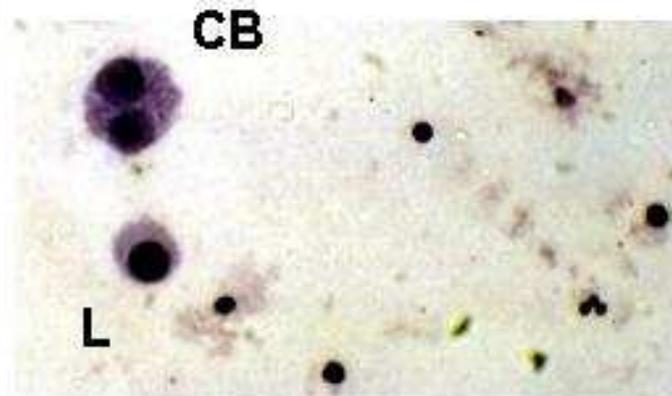


Figura 2.

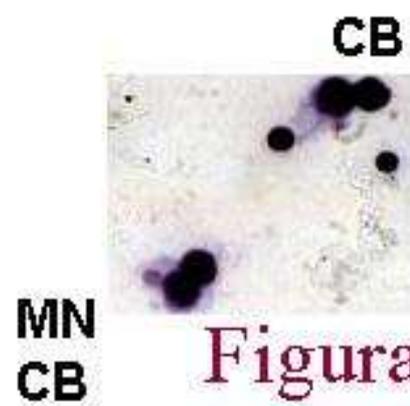


Figura 3.

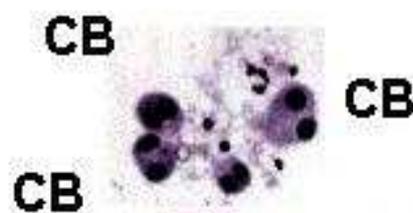


Figura 4.

Fig.5. : Detalle de un linfocito bloqueado con citochalasin B (CB) y de un linfocito normal (L).

Fig.6. : Detalle de linfocito bloqueado con citochalasin B (CB).

Fig.7. : Grupo de células en donde se observa un linfocito bloqueado con 2 núcleos y 2 micronúcleos en su citoplasma: uno, con halo refringente en su interior y por ello desestimado (MN falso; otro con los requisitos exigidos en el recuento (MN verdadero).

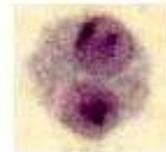
Fig.8. : Detalle de los dos tipos de micronúcleos descritos en la imagen anterior: uno verdadero; el otro desestimado por su halo de refringencia periférico.

Fig.9. : Imagen de linfocito bloqueado con micronúcleo en su interior (MNCB).

CB



Figura 5.^L



CB

Figura 6.

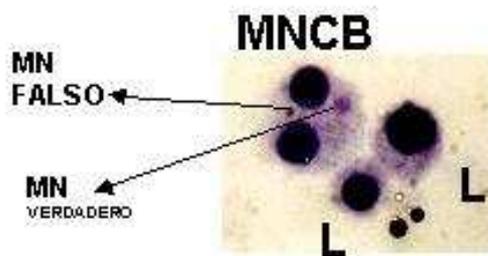
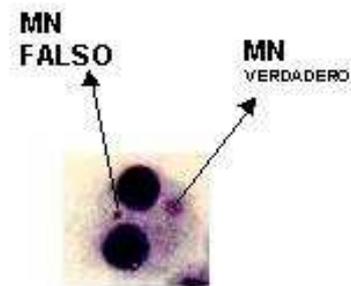


Figura 7.



MNCB

Figura 8.



MNCB

Figura 9.

Fig.10. : Detalle de linfocito bloqueado sin micronúcleo (CB).

Fig.11. : Detalle de linfocito bloqueado con un sólo micronúcleo (MNCB).

Fig.12. : Detalle de linfocito bloqueado con dos micronúcleos (MNCB).

Fig.13. : Detalle de linfocito con un micronúcleo (MNCB).

Fig.14. : Detalle de las dos células típicas estudiadas, con micronúcleo (MNCB) y sin él (CB).

Fig.15. : Detalle de célula bloqueada con micronúcleo intracitoplasmático.

Fig.16. : Detalle de dos células bloqueadas; con micronúcleo (MNCB) y sin micronúcleo (CB).



CB

Figura 10.



MNCB

Figura 11.



MNCB

Figura 12.



MNCB

Figura 13.



MNCB

CB

Figura 14.



MNCB

Figura 15.

MNCB



CB

Figura 16.

Fig.17. : Grupo de células bloqueadas. Observense tres células sin micronúcleo (CB) y una con un micronúcleo intracitoplasmático (MNCB).

Fig.18. : Grupo de células: dos linfocitos de aspecto normal (L) y un linfocito bloqueado con un micronúcleo en su interior (MNCB).

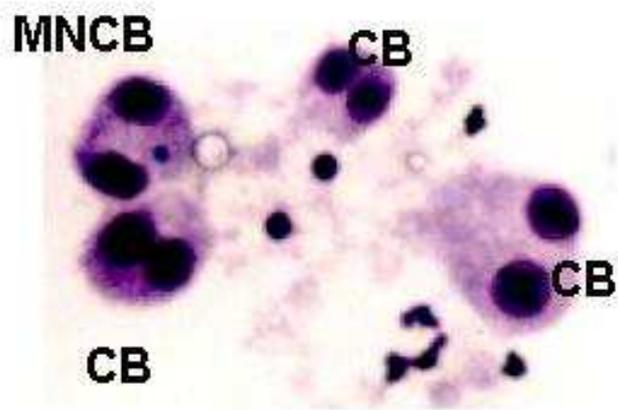


Figura 17.

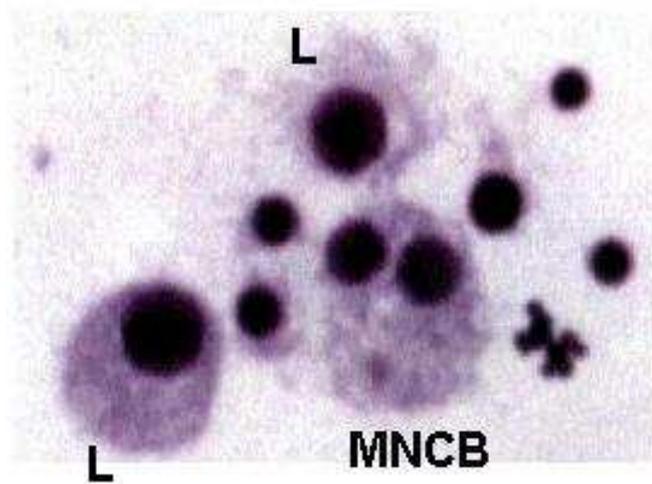


Figura 18.

Diferentes detalles de los linfocitos bloqueados con citochalasin B:

Fig.19. : Célula típica de “buzo” con dos núcleos de igual tamaño en su interior y citoplasma conservado (CB).

Fig.20. : Célula binucleada con micronúcleo (MNCB).

Fig.21. : Detalle de dos células bloqueadas con citochalasin. Obsérvese una de ellas con micronúcleo (MNCB) y otra sin micronúcleo (CB).

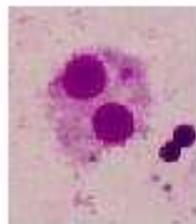
Fig.22. : Detalle de la imagen anterior resaltando el micronúcleo (1MN).

Fig.23. : Linfocito bloqueado con micronúcleo y citoplasma conservado (MNCB).



CB

Figura 19.



MNCB:

1MN

Figura 20.

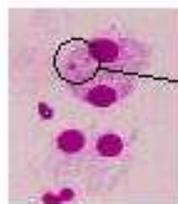


MNCB:

1MN

CB

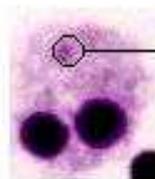
Figura 21.



MNCB:

1MN

Figura 22.



MNCB:

1MN

Figura 23.

Fig.24. : Visión panorámica de un campo microscópico completo obtenido del cultivo de linfocitos bloqueados con citochalasina B a las 72 horas (x 400).

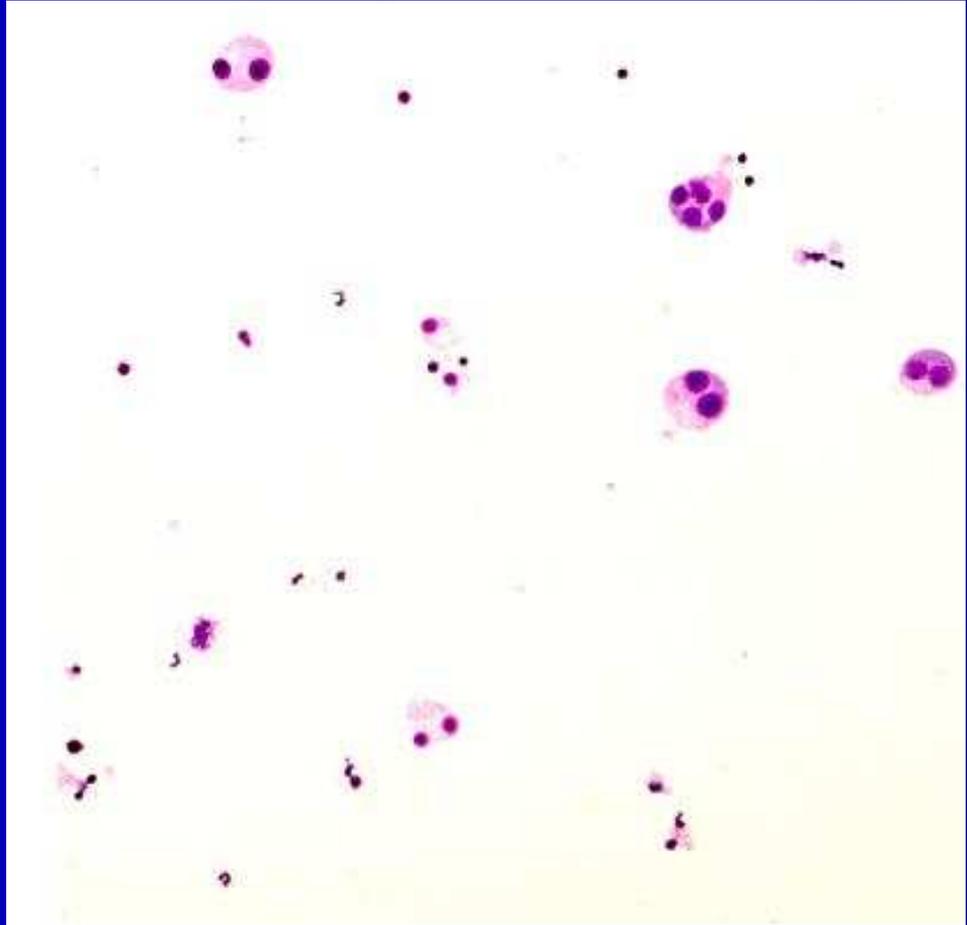


Figura 24.

CAPITULO VI.-DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

Este estudio ha pretendido elaborar un protocolo experimental para alcanzar, los dos objetivos propuestos. Nuestro **primer objetivo** ha sido establecer una relación dosis-respuesta entre la dosis de radiación y la frecuencia de aparición de micronúcleos mediante el test de micronúcleos en linfocitos humanos de sangre periférica irradiados con bloqueo citocinético.

El método del Bloqueo Citocinético en los cultivos de linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica, y cultivados directamente de sangre, descrito por FENECH y MORLEY (1985), basado en unas primeras observaciones realizadas por CARTER (1967), parece, en estos momentos, uno de los mejores test de micronúcleos con fines de determinación de las dosis de radiación absorbida (KORMOS y KOTELES, 1988; RAMALHO y cols., 1988; PROSSER y cols., 1988; GATENBERG y cols., 1991; BALASEM y ALI, 1991; BAN y cols., 1993; KIM y cols., 1993; WUTTKE y cols., 1993; FENECH, 2000).

En los primeros años de investigaciones con el test se indicó que el test de determinación de micronúcleos en los linfocitos de sangre periférica se podría utilizar como indicador biológico en casos de exposiciones a radiaciones ionizantes (COUNTRYMAN y HEDDLE, 1976; HUBER y cols., 1983; KREPINSKY y HEDDLE, 1983; HODGTEDT, 1984; NORMAN y cols., 1984; ARMERO y cols., 2000; ALCARAZ, 2000) sobre todo, tras las últimas modificaciones técnicas que recomiendan el estudio de los micronúcleos tras la primera división mitótica (PINCU y cols., 1984; FENECH y MORLEY, 1985, 1986; KORMOS y KOTELES, 1988; BALASEM y ALI, 1991; KIM y cols., 1993), y tras la descripción de algunos autores en donde se exponen relaciones proporcionales en las curvas dosis-respuestas obtenidas en exposiciones “in vitro” (ALMASSY y cols., 1986, 1987; BAN y cols., 1993). En nuestro estudio hemos encontrado una relación lineal entre las dosis de radiación utilizadas y la frecuencia de aparición de micronúcleos.

La curva dosis-respuesta obtenida de la exposición “in vitro” de las muestras de sangre de donantes sanos irradiados con radiación gamma, se adapta también a la ecuación Lineal, con una gran significación estadística y un porcentaje de fiabilidad del 99.74% ($r^2= 0.9974$). Esto puede interpretarse como suficiente fiabilidad para la estimación de la dosis de radiación en función del número de micronúcleos que se presentan en linfocitos humanos irradiados, estimulados a proliferar y bloqueados con Cyt.B con citoplasma conservado. Al menos, dentro del rango de dosis situado entre 1.6 cGy - 1636 cGy, a una tasa de dosis de 30.2 cGy/s.

Las muestras de sangre total “in vitro” expuestas a diferentes dosis de rayos X dentro del campo de irradiación en radioscopia con intensificador de imagen, también se han adaptado a una curva dosis-respuesta con una relación Lineal, con correlación estadísticamente significativa, y una fiabilidad del 92.37%; lo cual supone suficiente significación para la estimación de la dosis de radiación absorbida, en función de su recuento de micronúcleos. En este caso, el rango de dosis experimentalmente obtenido es de 0.38-334.86 cGy, sin necesitar una

especial extrapolación teórica de los resultados obtenidos para las dosis mas bajas.

A lo largo de los últimos años otros estudios han puesto de manifiesto diferentes tipos de curva dosis-respuesta; POHL-RULING y cols., (1983), estudiando la inducción de aberraciones cromosómicas (en anillo y dicéntricos) en linfocitos humanos irradiados con rayos X, describieron una curva dosis-respuesta no Lineal para dosis inferiores a 30 cGy; no encontrando correlación significativa entre el número de aberraciones y la dosis de rayos X por debajo de 5 cGy

Mas específicamente, en relación con el incremento de la frecuencia de los micronúcleos, las relaciones dosis-respuestas obtenidas han sido diferentes según los tipos de estudios realizados (citoplasma no conservado, conservado, con bloqueo citocinético). En ocasiones ha sido una relación Lineal para el rango de 5-50 Gy para linfocitos humanos irradiados con rayos X (FENECH y MORLEY, 1985, 1986). Aunque también han obtenido respuestas Lineales otros numerosos autores (HUBER y cols., 1983; BAUCHINGER, 1984; PINCU y cols., 1984; FENECH y MORLEY, 1985, 1986; PROSSER y cols., 1988; KORMOS y KOTELES, 1988; LITTLEFIELD y cols., 1979; BALASEM y ALI, 1991; MITCHELL y NORMAN, 1987; EREXSON y cols., 1991; ALCARAZ y cols., 1999, 2000).

En otras ocasiones se han descrito una curva Lineal-cuadrática (BETTEGA y cols., 1980; HUBER y cols., 1983; KREPINSKY y HEDDLE, 1983; KHADZHIDEKOVA, 1989; KORMOS y KOTELES, 1988; ALMASSY y cols., 1987; EREXSON y cols., 1991; KIM y cols., 1993).

Según diferentes estudios, la relación observada varía con la dosis de radiación. La relación es Lineal para rayos X, gamma y radiación beta por encima de 2 Gy, lo que se contrapone con la relación Lineal-cuadrática observada frecuentemente en el analisis de las aberraciones cromosómicas (KORMOS y KOTELES, 1988; RAMALHO y cols., 1988; HALL y WELLS, 1988; FENECH y MORLEY, 1985, 1986; MITCHELL y NORMAN, 1987). Otros autores (PROSSER

y cols., 1988) describen que por encima de 1 Gy la frecuencia de micronúcleos con bloqueo citocinético (CB) es similar al observado en la frecuencia de las aberraciones totales pero por debajo de 1 Gy el nivel de aberraciones es relativamente más alto.

En años anteriores, incluso se ha descrito una curva no Lineal en el incremento de micronúcleos expuestos a bajas dosis de radiación de baja LET, como la descrita por POHL-RULING y cols., (1983) para las aberraciones cromosómicas.

Las diferentes respuestas observadas en las curvas dosis-respuestas obtenidas parecen variar con el tipo de radiación utilizado. Lineal para rayos X (de 100 keV), con la eficacia biológica relativa, que cuanto es mayor es más intensa la relación Lineal-cuadrática (KIM y cols., 1993) y con el tiempo del cultivo, en el caso de las muestras in vitro (HUBER y cols., 1983). Algunas diferencias parecen deberse a cambios en las técnicas utilizadas y en los criterios de identificación de los micronúcleos entre los diferentes laboratorios (ALMASSY y cols., 1987).

Las frecuencias espontáneas o basales descritas en nuestros cultivos de linfocitos de sangre periférica es de 0.012 MN/célula CB en los cultivos no irradiados. Esta frecuencia espontánea es igual a la observada por algunos autores (HUBER y cols., 1983; PROSSER y cols., 1988; BALASEM y ALI, 1991; KIM y cols., 1993), y algo mayor a la descrita por otros estudios (AGAMOHAMMADI y cols., 1984; KREPINSKY y HEDDLE, 1983; FENECH y MORLEY 1985).

Sin embargo, la mayoría de los trabajos revisados recomiendan realizar el recuento de MN sobre 500 células bloqueadas para minimizar estas diferencias (GATENBERG y cols., 1991). Sobre 500 células CB, la frecuencia espontánea determinada en nuestros controles es de 6.2 MN/500 CB. Estos resultados, también se encuentran incluidos dentro de la franja de frecuencia descrita por los diferentes autores (FENECH y MORLEY, 1985; EREXSON y cols., 1991; GARAJ-VRHOAC y cols., 1992; KIM y cols., 1993; FENECH, 2000).

Historicamente esta frecuencia espontánea ha ido disminuyendo con el desarrollo técnico y metodológico. Una frecuencia de MN entre 10-15/500 células era normal en el test de micronúcleos sin Cyt.B, mientras que ha disminuído a 5 MN/500 CB su frecuencia basal en algunos estudios al utilizar el Bloqueo Citocinético con Cyt.B (FENECH y MORLEY, 1985; FENECH, 1993; FENECH, 2000), con lo que ha mejorado sensiblemente la sensibilidad del test..

La introducción de un agente mutágeno o genotóxico conocido, necesario como control de calidad del test de micronúcleos (LENARCZYK y SLOWIKOWSKA, 1995) en nuestro caso, lo ha constituido la radiación ionizante, objeto en gran medida de nuestro estudio. Sin embargo, hemos creído conveniente incorporar un segundo control al test y que hemos denominado como **control positivo**. La utilización de sustancias antioxidantes, cuyo efecto protector frente al aumento de la frecuencia de micronúcleos radioinducida, sirve para contrastar la diferente sensibilidad del test y la regulación del efecto lesivo inducido por la radiación que se objetiva también por la frecuencia de micronúcleos.

Estas sustancias y su efecto protector, posiblemente por su efecto “eliminador de radicales libres” ha sido objeto de estudio por nuestro mismo grupo de investigación.

En nuestro trabajo, se ha seleccionado a partir de las curvas dosis respuesta las dosis de 206 cGy como adecuadas y suficientes para la realización de las experiencias “in vitro” con las supuestas sustancias protectoras, ya que permite tener una dosis suficiente de radiación para producir el daño cromosómico necesario que permita la evaluación de un posible efecto protector de dichas sustancias.

En nuestro trabajo, las sustancias antioxidantes ensayadas, han provocado una reducción significativa de la frecuencia de micronúcleos esperada tras la irradiación ($p < 0,001$), lo cual nos permite llegar a la conclusión de que las sustancias antioxidantes, administrados antes de la irradiación, reducen significativamente el daño cromosómico inducido tanto “in vivo” como “in vitro” por

la radiación ionizante (REDONDO y cols., 1999; CASTILLO y cols., 2000; ALCARAZ y cols., 1999, 2000).

A su vez se ha observado una reducción significativa de la frecuencia de micronúcleos esperada tras la irradiación ($p < 0,001$) si las sustancias antioxidantes se administran inmediatamente después de la exposición a la radiación, tal y como algunos autores sugieren (SHIMOI y cols., 1996; SARMA y KESAVAN, 1993; ABRAHAM y cols., 1993) con diferentes técnicas de micronúcleos (médula ósea y linfocitos).

Con todo, la finalidad de este primer objetivo respecto de confirmar la utilidad del test en nuestro medio y determinar la relación dosis-respuesta (en este caso lineal para todas las dosis utilizadas), sólo ha tenido como objeto contrastar la fiabilidad y sensibilidad del test en nuestras manos, antes de la aplicación en la determinaciones sobre los pacientes sometidos a procedimientos médicos que implican una exposición a radiación ionizante, con plena justificación clínica.

Uno de los objetivos de la radiobiología es el desarrollo y aplicación de ensayos que sean capaces de determinar las lesiones ocasionadas por la utilización de la radiación ionizante en los diversos campos de las actividades humanas. Junto con el perfeccionamiento de técnicas dosimétricas físicas en exposiciones ocupacionales, se han desarrollado también diversos métodos biológicos para la evaluación individual de las dosis de radiación absorbidas. Estos indicadores o dosímetros biológicos se basan en la existencia de distintos niveles de alteraciones inducidas por la radiación en la organización biológica, tanto a nivel molecular como a nivel subcelular, celular, tisular e incluso a nivel orgánico (KOTELES Y BIANCO, 1982).

Se han seleccionado para nuestro estudio tres usos médicos de las radiaciones ionizantes que están ampliamente aceptados para comprobar un posible efecto lesivo de la radiación empleada mediante el test de micronúcleos. Respecto a las dosis de radiación empleada engloba procedimientos con dosis

bajas (radiodiagnóstico y exploraciones gammagráficas) y medias (tratamiento con I¹³¹ del cáncer de tiroides).

Desde el punto de vista de las radiaciones empleadas en **RADIODIAGNÓSTICO MEDICO** el test mayoritariamente aceptado desde hace algunos años para este objetivo es el análisis de las aberraciones cromosómicas (en anillo y dicéntricas) en linfocitos de sangre periférica, estimulados “*in vitro*” para entrar en actividad mitótica (BIANCHI y cols., 1993; POHL-RULING y cols., 1983). Sin embargo, la dosimetría cromosómica tiene sus limitaciones, sobre todo en la evaluación de la dosis en exposiciones crónicas; la estimación de la dosis se complica por la vida limitada de los linfocitos y, por tanto, por la eliminación continua del daño cromosómico radioinducido. Por otra parte, el tiempo necesario para estudiar un número estadísticamente suficiente de células en metafase, así como la necesidad de personal entrenado y experimentado en su lectura, lo hace irrealizable en numerosas ocasiones y justifica la búsqueda de métodos alternativos, más rápidos, sencillos, baratos y sensibles, que tengan una resolución comparable a la del análisis directo de las aberraciones cromosómicas (KORMO y KOTELES, 1988; FENECH y MORLEY, 1985a; FENECH y MORLEY, 1985b, KIM y cols., 1993; ALMASSY y cols., 1987; PROSSER y cols., 1988). Entre estos métodos se encuentran las técnicas de hibridación con fluorescencia “*in situ*” (LUCAS y cols., 1989), medida de la condensación prematura de los cromosomas (BLAKELY y cols., 1995), la técnica del intercambio de cromátidas hermanas (HUNDÍ y cols., 1995) o la inducción de micronúcleos en linfocitos con bloqueo citocinético (FENECH y MORLEY, 1985a). Este último es el que nosotros estamos en disposición de realizar.

Hace más de tres décadas que FLIEDNER (1964) describió la inducción de micronúcleos tras una exposición a neutrones y radiación gamma “*in vivo*”. Desde entonces distintos autores han descrito la aparición de micronúcleos en diferentes situaciones normales y patológicas (IMREH y cols., 1981; NORMAN y cols., 1984; BAN y cols 1993). Durante los últimos años se ha sugerido que el test de determinación de micronúcleos en los linfocitos de sangre periférica con bloqueo citocinético se podría utilizar como indicador biológico en casos de exposiciones a radiaciones ionizantes (NORMAN y cols., 1984; COUNTRYMAN y

cols., 1976; HUBER y cols., 1983; KREPINSKY y HEDDLE, 1983; HOGSTEDT, 1984); sobre todo, tras las últimas modificaciones técnicas que recomiendan el estudio de los micronúcleos tras la primera división mitótica (KORMOS Y KOTELES, 1988; FENECH y MORLEY, 1985a ; KIM y cols., 1993; PINCU y cols., 1984; BALASEM y ALÍ, 1991), y tras la descripción en la que algunos autores exponen relaciones proporcionales en las curvas dosis-respuestas obtenidas en exposiciones “*in vitro*” (BAN y cols., 1993; ALMASSY y cols., 1986; ALCARAZ y cols., 2000).

El método de bloqueo citocinético (BC) en los cultivos de linfocitos humanos, obtenidos de sangre periférica, y cultivados directamente de sangre total, descrito por FENECH Y MORLEY (1985), con sus modificaciones posteriores (FENECH 1993; KIRSCH-VOLDERS; FENECH, 2001), parece en estos momentos, el mejor test de micronúcleos con fines de determinación de las dosis de radiación absorbida (KORMOS y KOTELES ,1988; KIM y cols., 1993; PROSSER y cols., 1988; BAN y cols. 1993; BALASEM y ALÍ, 1991; RAMALHO y cols., 1988; GANTENBERG y cols., 1991; WUTTKE y cols.,1993), en las exposiciones parciales o corporales totales, en sobreexposiciones accidentales, y por todo ello se esta utilizando en exposiciones de diagnóstico médico (HUBER y cols., 1983; BALASEM y ALÍ, 1991; KOKSAL y cols., 1989; YAGER y cols., 1990).

En esencia, el test de micronúcleos en cultivo de linfocitos con bloqueo citocinético se utiliza para poner de manifiesto la capacidad genotóxica y mutagénica de los diferentes agentes químicos y físicos (ALMASSY y cols., 1986; FENECH, 1993; FENECH y MORLEY, 1987). Nuestros resultados ponen de manifiesto un incremento estadísticamente significativo de la frecuencia de micronúcleos en las muestras irradiadas, tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”, comparadas con las muestras respectivas sin exposición a la radiación ionizante; ya que, por tanto, indican un daño cromosómico inducido por la exposición a la radiación como consecuencia de la exploración radiológica médica. Un efecto similar de los rayos X sobre el incremento de la frecuencia de micronúcleos con dosis empleadas en el radiodiagnóstico médico, se ha descrito en diferentes ocasiones, aunque en todos los casos son estudios sobre un número muy

pequeño de personas expuestas (YAGER y cols., 1990; FENEC y MORLEY, 1986; EASTMOND y TUCKER, 1989; FENECH y cols., 1990).

En nuestro trabajo, la media aritmética de MN/500 CB de las muestras no irradiadas es la mitad de la frecuencia observada en las muestras irradiadas, lo que parece acorde con la interpretación de otros autores (KORMOS y KOTELES, 1988; PROSSER y cols., 1988), que describen una adecuada sensibilidad del test cuando la exposición a la radiación pueda suponer el doble de micronúcleos de la frecuencia basal obtenida. Quizá estos resultados podrían justificar la realización de una base de datos del personal profesionalmente expuesto a radiaciones ionizantes como patrón de comparación frente a exposiciones accidentales o exposiciones parciales posteriores que permitan la determinación de la dosis de radiación en ausencia de procedimientos físicos.

Algunos autores han descrito que grandes exposiciones a radiaciones ionizantes, tales como las producidas tras las explosiones atómicas en Japón, no provocan un aumento significativo de la frecuencia espontánea de micronúcleos en los individuos expuestos y estudiados 40 años más tarde con la técnica del bloqueo citocinético (BAN y cols., 1993). Estos resultados se han explicado en base a que la "memoria" del test estaría reducida a la vida del linfocito expuesto a la radiación, aproximadamente unos 3 años, ya que éste es quien llevaría en forma latente la posibilidad de expresión del micronúcleos cuando que se le fuerza a proliferar mediante esta técnica. Una vez desaparecido el linfocito, desaparecería la capacidad de inducción del micronúcleos, y por tanto la posibilidad de estimación de la dosis absorbida. En este sentido, también se ha descrito la ausencia de significación estadística entre las dosis de radiación de exploraciones radiológicas realizadas al menos 2 años antes de la determinación de la frecuencia de micronúcleos (NORMAN y cols., 1984), y que podría explicarse por la pérdida de la "memoria" de la exposición, al ir desapareciendo los linfocitos que mantenían de forma latente, la lesión inducida por la radiación ionizante.

Dada la complejidad del análisis clásico de aberraciones cromosómicas, los estudios se han centrado en un número escaso de pacientes

irradiados por exploraciones diagnósticas en donde sólo en algunos casos se ha llevado a cabo la administración de contrastes radiológicos intravasculares. Algunos autores describen el aumento de aberraciones cromosómicas en los linfocitos periféricos de pacientes sometidos a procedimientos radiológicos, tales como enemas opacos para el estudio del colon, angiografías, cateterizaciones cardiacas y urografías intravenosas (HADNAGY y cols., 1982; NORMAN y cols., 2001; KUCEROVA y cols., 1976; MATSUBARA y cols., 1982; GOMEZ MORAGA y cols., 1996). Otros estudios ponen de manifiesto que la exposición "in vitro" a rayos X incrementa proporcionalmente la aparición de aberraciones cromosómicas conforme aumenta proporcionalmente la concentración del contraste radiológico en el medio (MATSUBARA y cols., 1982). Por último, otros autores describen que el daño cromosómico no es debido exclusivamente a la exposición radiológica, sino a la sumación del efecto lesivo del contraste radiológico tanto "in vitro" como "in vivo" (HADNAGY y cols., 1982). En estos casos llega a observarse una ligera significación estadística (NORMAN y cols., 1984; FENECH y cols., 1990; HADNAGY y cols., 1982; CALLISEN y cols., 1979; NORMAN y cols., 2001; MATSUDAIRA y cols., 1980).

Se ha intentado explicar este fenómeno en el sentido de que los linfocitos suspendidos en contraste radiológico podrían absorber una mayor dosis de radiación que las células expuestas en el mismo campo en sangre total, debido a la absorción fotoeléctrica producida por los átomos de yodo del contraste radiológico (HADNAGY y cols., 1982, MATSUBARA y cols., 1982, MATSUDAIRA y cols., 1980, NORMAN y cols., 2001). Este efecto fotoeléctrico del yodo provocaría una mayor interacción primaria de los fotones con los átomos de yodo, teniendo como consecuencia un incremento del número de electrones secundarios que transfieran su energía a las células adyacentes al contraste radiológico (NORMAN y cols., 1978; HADNAGY y cols.; CALLISEN y cols., 1979; NORMAN y cols., 2001). Sin embargo, para otros autores, sólo concentraciones superiores al 18% "in vitro" de contraste radiológico acompañando a la exposición con rayos X sería capaz de mostrar incremento significativo de alteraciones cromosómicas (MATSUBARA y cols., 1982).

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la irradiación “in vivo” (muestra IV) no presenta diferencias significativas respecto de las muestras irradiadas “in vitro” (muestra III); lo cual podría poner de manifiesto que la hemodilución y la irradiación parcial del paciente (que tenderían a disminuir el efecto de inducción de micronúcleos) podría quedar compensada por el incremento del daño celular inducido por la administración del contraste radiológico en las muestras del paciente “in vivo” (que tendería a incrementar el daño y la inducción de micronúcleos). Sin embargo, todas las experiencias que hemos realizado para poner de manifiesto experimentalmente este efecto inductor del yodo en nuestros pacientes (GOMEZ MORAGA y cols., 1996; GOMEZ MORAGA y cols., 1996), como en la comparación con nuestras curvas dosis-efectos de referencia (ALCARAZ y cols., 2000; ALCARAZ y cols., 2001), no han conseguido demostrar este efecto teórico del yodo; al menos, a las concentraciones entre el 5-7% de Hexabrix® que son las que hemos utilizado al considerarlas extrapolables a las empleadas en el radiodiagnóstico médico. Podría ocurrir que, tal y como se ha descrito experimentalmente (MATSUBARA y cols., 1982), si la concentración del contraste en sangre llegase al 18%, la frecuencia de micronúcleos aumentase significativamente.

Por otra parte, la obtención de la frecuencia basal de micronúcleos es determinante, ya que en función de dicha frecuencia basal se establecerá el límite inferior de dosis estimable por la técnica, e incluso la significación estadística obtenida en nuestros pacientes. La mayor parte de las innovaciones metodológicas del test de determinación de los micronúcleos han ido dirigidas a una reducción progresiva de la frecuencia basal espontánea determinadas por las diferentes modalidades del test.

En nuestro estudio, la frecuencia espontánea es de 0,008 MN/célula CB en los cultivos no irradiados y de 0,006 MN/célula CB, en los cultivos de linfocitos que han estado en contacto con el contraste radiológico y no irradiados. Esta frecuencia basal es prácticamente la mitad de la observada por otros autores (KIM y cols., 1993; PROSSER y cols. 1988; HUBER y cols., 1983; BALASEM y ALÍ, 1991) como frecuencia basal espontánea, igual a la descrita por otros autores

(PINCU y cols., 1984), o representa el doble de la encontrada en otros estudios (KREPINSKY A.B. y HEDDLE, 1983; AGHAMOHAMMADI y cols., 1984); e incluso llega a ser el triple de la descrita por (FENECH y MORLEY 1985a). Para minimizar estas diferencias, la mayoría de estudios revisados realizan el recuento de MN sobre 500 células bloqueadas (GANTENBERG y cols., 1991). Así, la frecuencia basal determinada en nuestros controles está entre 4 y 6 MN/500 CB, siendo "*in vivo*" ligeramente inferior a la obtenida "*in vitro*", aunque sin diferencias significativas. Estos resultados, también se encuentran incluidos dentro de la franja de frecuencia basal espontánea descrita por diferentes autores (FENECH y MORLEY 1985a; KIM y cols., 1993; EREXSON y cols., 1991; GARAJ-VRHOAC y cols., 1993).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que el número de anomalías cromosómicas aumenta con la edad o el envejecimiento en el hombre (KORMOS y KOTELES, 1988; KIM y cols., 1993, NORMAN y cols., 1984; HOGSTEDT, 1984; FENECH y MORLEY, 1986; HEDNER y cols., 1982; LEZHAVA, 1984; NORMAN y cols., 1985). Los diferentes estudios parecen mostrar una progresiva disminución de la integridad del material genético con el aumento de la edad. En nuestro trabajo, el incremento de la edad de los pacientes estudiados muestra una elevación estadísticamente significativa de la frecuencia espontánea de micronúcleos, que resulta similar al descrito previamente en numerosas ocasiones (BAN y cols., 1993; YAGER y cols. 1990; FENECH y MORLEY, 1986).

Se ha llegado a cuantificar el incremento de la frecuencia de micronúcleos en los donantes sanos en un 4,3% micronúcleos por año (BAN y cols., 1993). Para otros autores sería de 19% por año (BAN y cols., 1993), aunque esta discrepancia podría deberse a las diferentes edades de los grupos de donantes estudiados, una edad media de 40 años en el primer estudio (FENECH y MORLEY, 1985b) y de 61 años en el segundo (BAN y cols., 1993). Este incremento de la frecuencia de micronúcleos con la edad se ha atribuido a diferentes factores: a) defectos de la mitosis celular (FENECH y MORLEY, 1986); b) elevada tasa de ruptura cromosómica espontánea (FENECH y MORLEY, 1986; LEZHAVA, 1984); c) acumulación e daño mutágeno; d) o bien debido al proceso

de envejecimiento en sí mismo que provoca cambios tales como la alteración del metabolismo celular y/o disminución de la capacidad de reparación celular (HOGSTEDT, 1984). Incluso, podría ser la suma de todas estas posibilidades (PINCU, y cols., 1984).

En nuestro estudio no se ha observado influencia significativa del sexo sobre la inducción de micronúcleos. Resultados similares se han descrito en estudios *“in vitro”* e *“in vivo”* (NORMAN y cols., 1984, BAN y cols., 1993) aunque, en algún caso, también se ha puesto de manifiesto un incremento de la frecuencia basal de mujeres sobre la presentada en hombres, y que se ha explicado en base a la existencia del cromosoma X (BAN y cols., 1993). En este sentido parece importante que cada laboratorio acumule sus propios datos sobre la frecuencia espontánea de micronúcleos en base a un gran número de individuos estudiados bajo condiciones similares (NORMAN y cols., 1984, BAN y cols., 1993). Tampoco se ha encontrado una influencia significativa del tabaquismo sobre la frecuencia espontánea de micronúcleos en nuestro estudio. Numerosos autores han descrito esta ausencia de relación con diferentes modalidades del test de determinación de MN (BAN y cols., 1993; OBE y cols., 1982). Sin embargo, parece ampliamente difundido que el hábito de fumar es una posible fuente mutágena y/o carcinogénica en el hombre. Algunos autores han probado estos efectos con ensayos de cromátidas hermanas (LAMBERT y cols., 1978; HUSGAFVEL-PURSIAINEN y cols., 1990), con análisis de aberraciones cromosómicas (HOGSTEDT y cols., 1983; STENSTRAND, 1985), e incluso con el test de los micronúcleos (HOGSTEDT, 1984). Estas discrepancias se han interpretado como una falta de sensibilidad del test de los micronúcleos, que se muestra menos sensible que el análisis cromosómico para detectar el pequeño efecto que podría tener el hábito de fumar sobre la frecuencia de micronúcleos (NORMAN y cols., 1985; HUBER y BAUCHINGER, 1990).

En definitiva, se puede decir, en función de los resultados obtenidos de los pacientes irradiados durante procedimientos complejos de **RADIODIAGNÓSTICO** que:

- Las dosis de radiación utilizadas en las exploraciones radiológicas estudiadas, producen aumento significativo de la frecuencia de aparición de micronúcleos, que se interpreta como un daño genotóxico y mutagénico inducido por los rayos X en dichos pacientes. Aunque queda por establecer las consecuencias biológicas de este incremento de micronúcleos.
- El contraste radiológico no induce aumento significativo de micronúcleos a las dosis empleadas en radiodiagnóstico.
- La frecuencia espontánea de micronúcleos aumenta con la edad.
- El hábito tabáquico no presenta una relación significativa con el número de micronúcleos.
- Para la utilización de este test como dosímetro biológico sería necesaria la determinación individualizada y previa de la frecuencia espontánea basal de micronúcleos en cada una de las personas expuestas a la radiación, lo cual permitiría la comparación con un patrón previo que aumentaría la sensibilidad del test.

En definitiva, la dosimetría biológica puede tener un cierto número de aplicaciones interesantes en la actualidad. La más evidente sería la de los casos de accidentes radiológicos en ausencia de dosimetría física (KIM y cols., 1993, BAN y cols., 1993). Algunos métodos físicos de dosimetría podrían ser complementados con los ensayos biológicos, por ejemplo, tras exposiciones parciales en las que el dosímetro queda fuera del campo de radiación. Si la variabilidad de las frecuencias detectadas se pudiera atribuir a la sensibilidad individual, sería un método muy sensible para la estimación del efecto biológico de los accidentes que la dosimetría puramente física. De la misma forma, podría ser un test objetivo para valorar la sensibilidad individual a radiaciones ionizantes para la selección del personal profesionalmente expuesto. A pesar de ello, todavía queda por establecer la repercusión real sobre la salud de este incremento de la frecuencia de MN inducidos por la radiación ionizante.

Un **segundo objetivo** es determinar el efecto genotóxico de la radiación ionizante utilizada en procedimientos terapéuticos y diagnósticos en

MEDICINA NUCLEAR. Por un lado, se ha seleccionado el tratamiento con yodo radiactivo utilizado en el cáncer de tiroides por constituir una de las técnicas de medicina nuclear en las que se utilizan las dosis de radiación más elevadas; y, por otro lado, las exploraciones diagnósticas gammagráficas que constituyen un ejemplo de las exploraciones más frecuentes de un servicio de medicina nuclear.

En este sentido, durante los últimos 50 años el tratamiento con yodo radiactivo se ha considerado como un tratamiento válido y efectivo de diferentes enfermedades tiroideas tales como el hipertiroidismo y el tratamiento oncológico del cáncer bien desarrollado (HAYNIE y cols., 1995; ZANZONICO y cols., 1997). Junto con estos efectos beneficiosos, pueden producirse algunos efectos colaterales indeseables, al exponerse a la radiación ionizante otros tejidos normales (HAYNIE y cols., 1995; GUTIERREZ y cols., 1999). En el hipertiroidismo se han descrito como complicaciones más frecuentes la tiroiditis radioinducida y el hipotiroidismo permanente. En el cáncer de tiroides, el tratamiento con yodo radiactivo se administra tras la tiroidectomía total o parcial, y en donde las dosis de yodo radiactivo son mayores, las complicaciones suelen ser más diversas y de mayor frecuencia. Los efectos adversos agudos más comunes tras la terapia con yodo radiactivo son: tiroiditis radioinducida, sialoadenitis, aparición de diferentes síntomas gastrointestinales, alteraciones gustativas, disminución transitoria de la actividad de la médula ósea, e incluso la aparición de leucemia (BUSHNELL y cols., 1992; SWEENEY y cols., 1995; GUTIERREZ y cols., 1999). Ocasionalmente también se han descrito disfunciones gonadales reversibles en estos pacientes (RAYMOND y cols., 1989; PACINI y cols., 1994). Desde un punto de vista radiológico diferentes autores han determinado que la terapia con yodo radiactivo puede producir una pérdida estimada menor del 1 % del tiempo de vida esperado en los pacientes tratados (MONSIEURS y cols., 2000).

Además de estos riesgos, se ha descrito la posibilidad de inducción de un segundo tumor y del daño genético inducido por el tratamiento de

radioyodo, situación que han puesto de manifiesto algunos autores (ZANZONICO y cols., 1997; DOTTORINI y cols., 1996; GUTIERREZ y cols., 1999). El interés de este posible efecto carcinogénico inducido por el yodo radiactivo ha aumentado tras apreciarse un gran incremento de cáncer de tiroides en las poblaciones infantiles de Ucrania, tras el accidente nuclear de Chernobyl, y que se ha atribuido a la dispersión atmosférica y contaminación del medio ambiente con yodo radiactivo (KAZAKOV y cols., 1992; LIKHTAREV y cols., 1995).

Junto a esto, diferentes estudios epidemiológicos ponen de manifiesto que diferentes tipos de tumores sólidos se relacionan con la administración de yodo radiactivo empleado en el tratamiento del hipertiroidismo y del cáncer de tiroides. Se ha descrito un aumento en el riesgo de incidencias de leucemias y cáncer de vejiga (EDMONDS y SMITH, 1986), y cáncer de colon (DE VATHAIRE y cols., 1997). Sin embargo, dos estudios realizados sobre una población considerable no muestran ningún incremento significativo en las incidencias de leucemias en estos pacientes (DE VATHAIRE y cols., 1997; HALL y cols., 1992), ni tampoco un aumento de la frecuencia de aparición de un segundo tumor en los mismos (DOTTORINI y cols., 1995). Recientemente un estudio sobre la mortalidad de cáncer tras tratamiento con yodo radiactivo en adultos hipertiroides pone de manifiesto que no se observa ningún incremento en la mortalidad de los pacientes tratados (RON y cols., 1998).

Por otra parte, existen numerosos estudios epidemiológicos que estiman el riesgo de cáncer que monitorizan las poblaciones expuestas a carcinógenos y agentes genotóxicos con diferentes objetivos y que pretenden esclarecer los diferentes mecanismos de carcinogénesis (SAMET, 1997; NATARAJAN y cols., 1996). Entre estos, los ensayos citogenéticos sobre los linfocitos de sangre periférica son los más utilizados (tales como aberraciones cromosómicas, análisis de cromátides hermanas o micronúcleos) para detectar el daño cromosómico inducido por los diferentes agentes (EVANS, 1988; TUCKER y PRESTON, 1996, GUTIERREZ y cols., 1999). Los más recientes estudios sugieren que el incremento del número de estas alteraciones cromosómicas frecuentemente podrían predecir o determinar un incremento del riesgo de

aparición de un cáncer en los individuos portadores (HAGMAR y cols., 1994; BONASSI y cols., 1995).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio ponen de manifiesto el incremento de aparición de micronúcleos en los pacientes tratados por cáncer de tiroides, y vuelve, por tanto, a reforzar el criterio de validez del test de micronúcleos como un buen indicador del daño cromosómico inducido "in vivo" por la exposición humana a radiación ionizante. Del mismo modo que nosotros, otros estudios citogenéticos realizados en pacientes que han recibido yodo radiactivo han descrito aumentos significativos de aberraciones cromosómicas (BAUGNET-MAHIEU y cols., 1994; GUNDY y cols., 1996; M'KACHER y cols., 1997) y de micronúcleos (LIVINGSTON y cols., 1993; CATENA y cols., 1994; WUTTKE y cols., 1996; GUTIERRES y cols., 1999; MONSIEURS y cols., 2000; WATANABE y cols., 2000).

Se ha descrito que el número de micronúcleos determinados en la sangre de pacientes tratados con yodo radiactivo sería mas alta en la primera semana de la administración del mismo, y podrían permanecer elevados durante el primer año, llegando incluso a 3 años coincidiendo con la vida media estimada del linfocito en sangre periférica. Posteriormente, al desaparecer el linfocito, también desaparecería la posibilidad de la expresión del daño que permanecería latente en el linfocitos expuesto a la radiación ionizante (BUCKTON y cols., 1967; EVANS., 1986, GUITIERREZ y cols., 1999). OTTOSEN y cols.(1954) han descrito que los linfocitos podrían dividirse en dos grupos diferentes atendiendo a la duración de su vida: a) una pequeña parte tendría una supervivencia solo de 3 o 4 días, b) la mayor parte sobreviviría de 100 a 200 días. Para NORMAN y cols.(1965) la vida media de los linfocitos en una mujer hematologicamente normal es de 530 días mas menos 64 días; por tanto, la vida media de los linfocitos es muy variable, aunque puede existir un intervalo de 6 a 20 meses (media de 11.8), y que por tanto corresponde al periodo en donde la lesión podría ser detectada. Ello implicaría que el test de micronúcleos no debería ser empleado como dosímetro biológico mas allá del año desde la exposición al radio yodo.

La cinética de desaparición del número de micronúcleos “en exceso” tras la exposición genotóxica no está clara (MULLER y cols., 1996). Se ha intentado explicar mediante la muerte celular de los linfocitos lesionados, por un rápido desplazamiento por linfocitos no lesionados, e incluso también, mediante mecanismo de reparación celular del daño inducido (WATANABE y cols., 1998). Incluso, recientemente, se ha intentado poner de manifiesto una respuesta adaptativa del organismo frente a la inducción de micronúcleos (MONSIEURS y cols., 2000).

Actualmente se cuenta con la posibilidad de que un incremento en el nivel o número de alteraciones cromosómicas puede indicar un incremento en el riesgo de cáncer (HAGMAR y cols., 1994) . Por ello, algunos autores resaltan que estos estudios deberían ser cuidadosamente considerados en la evaluación de un posible daño genético tras la terapia con radioyodo. Sin embargo, los resultados de muchos estudios epidemiológicos que se han publicado (HALL y cols., 1992; RON y cols 1998) indican estas alteraciones cromosómicas no tienen necesariamente que ir asociadas con un incremento demostrado de riesgo de cáncer.

Tras los resultados obtenidos en nuestros pacientes tratados con yodo radiactivo, pretendimos asociar el tratamiento con yodo radiactivo en grupo de pacientes control con la administración de agentes antioxidantes radioprotectores (vitamina C, vitamina E, betacarotenos, flavonoides), con el fin de disminuir el efecto inductor de micronúcleos en los pacientes expuestos, y que no debería alterar los resultados del tratamiento sobre la glándula tiroides. Ello permitiría disminuir el efecto extratiroideo y genotóxico.

Los resultados que hemos obtenido “in vivo” sobre animales de experimentación e “in vitro” con sangre periférica podría permitir disminuir el efecto lesivo extratiroideo y genotóxico de la radiación con elementos que habitualmente se encuentra en componentes de la dieta habitual humana. Sin embargo, la consideración de Ensayo Clínico, obliga a un planteamiento más lento que constituiría la continuación del trabajo actual.

En otro orden de cosas, en este trabajo se ha pretendido determinar el efecto biológico de la radiación absorbida, en un estudio en el que hemos comparado la incidencia de micronúcleos con dos tipos de radiación interna (rayos X y radiación gamma).

Al establecer las curvas dosis-respuesta para estos tipos de radiación podemos utilizarlas para determinar cual seria la dosis de radiación que produce un efecto biológico equivalente al encontrado en el análisis de nuestro pacientes irradiados en procedimiento de medicina nuclear (terapéuticos y diagnósticos).

El procedimiento habitual para obtener una dosimetría humana precisa del análisis de diferentes pacientes para determinar la biodistribución del agente utilizado y su integración del área estudiada, estableciendo los resultados en forma de curva de actividad de un órgano o región explorada (ROI) (WATANABE y cols., 2000).

Se considera una desventaja que la estimación en medula ósea es imprecisa debido a la utilización de factores de biodistribución y a la dificultad de definición del área en estudio. Por ello, se ha publicado que un test que valore mejor el daño en medula ósea seria bienvenido (WATANABE y cols., 2000). En este sentido se ha trabajado con diferentes test que valoren el daño cromosómico.

Nosotros hemos puesto de manifiesto que el daño citogenético inducido a los linfocitos tras la terapia con yodo radiactivo a nuestros pacientes “in vivo” a los tres días de la administración puede ser considerado igual al daño observado tras una exposición a radiación externa de 136.916 mGy para la curva de radiación gamma (13.7 cGy), rango de dosis similar a los 33 cGy descritos por WATANABE y cols. (1998), o a los 30-37 cGy descrito por MONSIEURS y cols. (2000), sobre todo si se tiene en cuenta que sus frecuencias se determinaron a los 7 días de la administración de yodo radiactivo; y cuando dicen obtener una curva dosis-respuesta con solo dos puntos en su determinación.

Aunque se ha argumentado que las tasas de dosis y el tiempo de exposición son importantes factores para determinar las consecuencias biológicas de una determinada dosis de radiación, y que el efecto biológico en el tratamiento con yodo radiactivo estaría subestimado por su baja tasa de dosis y su tiempo de exposición más elevado (HALL y cols., 1994; WATANABE y cols., 2000); en nuestro caso el punto de partida es el efecto biológico a través de las curvas dosis-respuesta y no debería de considerarse afectado por dichos parámetros físicos.

GUNTER y cols. (1987) han descrito que las dosis de radiación en 10 sujetos que recibieron 200 mCi por cáncer de tiroides es 0.0047 Gy/mCi. Estos resultados son superponibles a los descritos por McEWAN (1977) que describe 0.0044 Gy/mCi y 0.0032 Gy/mCi todos ellos en médula ósea.

Sin embargo, BENUA y cols. (1962) describen que la dosis sobre 59 pacientes es como dosis corporal total de 2.67 Gy. Por tanto, la estimación de la dosis resulta ser muy variable.

La dosis media interna calculada para nuestros pacientes es de 0.0013 Gy/mCi tras su equivalencia con las curvas obtenidas para radiación gamma, aunque determinados a los tres días de la administración de yodo radiactivo.

La utilización del test de micronúcleos con bloqueo citocinético en las exploraciones diagnósticas de medicina nuclear (gammagrafía) no han puesto de manifiesto diferencias significativas con las frecuencias previas y consideradas patrones. Por ello, cabe destacar que son exploraciones en las que no se aprecian daño genético, y por tanto, según el test de micronúcleos ensayado carece de capacidad genotóxica y mutágena.

CAPITULO VII.-CONCLUSIONES

VI.CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer de los resultados obtenidos en el trabajo realizado, son las siguientes:

1. Existe una **relación dosis-respuesta Lineal** entre la dosis de radiación ionizante administrada y el número de micronúcleos en linfocitos humanos con Bloqueo Citocinético, irradiados “in vitro” tanto para rayos X como para radiación gamma.
2. La utilización médica de la radiación ionizante en pruebas complejas de **radiodiagnóstico médico** produce un incremento en la aparición de micronucleos como expresión del daño cromosómico y genotóxico inducido por la exposición a la radiación ionizante.

3. La utilización médica de la radiación ionizante en el **tratamiento radiológico del cáncer de tiroides con yodo radiactivo** produce un incremento en la aparición de micronucleos como expresión del daño cromosómico y genotóxico inducido por la exposición a la radiación ionizante.

4. La utilización médica de la radiación ionizante en pruebas **diagnósticas de Medicina Nuclear** no produce un aumento en la aparición de micronúcleos por lo que no supone daño cromosómico ni genotóxico inducido por la radiación ionizante administrada.V

CAPITULO VIII.-RESUMEN

VIII.RESUMEN

Se estudia la inducción de micronúcleos (MN) en linfocitos humanos con Bloqueo Citocinético (CB) en diferentes situaciones para establecer la existencia de una relación dosis-respuesta entre la exposición a la radiación ionizante y la frecuencia de aparición de MN. Se pretende determinar el límite inferior de la dosis de radiación que resulta posible estimar con este test y discutir la utilidad práctica del test de MN con CB como dosimetría biológica y estimar si existe un posible efecto lesivo de la radiación ionizante empleada en exploraciones complejas de Radiodiagnóstico Médico y en Medicina Nuclear.

Para ello se han realizado las siguientes experiencias: a) inducción de MN con dosis de rayos X y gamma en linfocitos humanos irradiados "in vitro" así como sometidos a la acción de diferentes agentes

antioxidantes, b) determinación de MN en muestras de sangre obtenidas de 25 pacientes irradiados en exploraciones complejas de Radiodiagnóstico Médico antes y después de la exploración radiológica, c) determinación de MN en muestras de sangre obtenidas de 26 pacientes irradiados en exploraciones diagnósticas de Medicina Nuclear y d) determinación de MN en muestras de sangre obtenidas de 25 pacientes irradiados en tratamiento ablativo de cancer de tiroides.

Los resultados muestran una relación Lineal respecto de la inducción de MN "in vitro" para las dosis de radiación (X y γ) utilizadas. El límite inferior de dosis de radiación que se puede estimar con el test oscila entre los 8-24 cGy para rayos X y 2-8 cGy para radiación gamma, según los criterios que se utilicen para su determinación.

Se aprecia un incremento significativo de MN tras la irradiación que suponen las exploraciones en los pacientes estudiados en Radiodiagnóstico médico y en los sometidos a tratamiento ablativo con ^{131}I , comparados con los valores controles obtenidos de los mismos pacientes previos al procedimiento radiológico ($p < 0,01$). No se aprecia un incremento significativo de MN tras la irradiación que suponen las exploraciones diagnósticas en los pacientes estudiados en Medicina Nuclear.

El test de los MN con Bloqueo Citocinético es una técnica sencilla, y fácil de reproducir que podría aplicarse en situaciones donde no es posible utilizar la dosimetría física. Su sensibilidad resulta adecuada para la estimación de dosis empleada en los diferentes procedimientos médicos, aunque queda por establecer las consecuencias biológicas reales que representa este incremento de MN. De igual forma podría utilizarse para valorar la sensibilidad individual a la radiación y determinar exposiciones a bajas dosis de radiación en pacientes o trabajadores profesionalmente expuestos si se cuenta con un patrón previo individual.

CAPITULO IX.-TABLAS Y GRÁFICAS

TABLA I
PACIENTES QUE DONARON MUESTRAS SANGUINEAS. IRRADIACION CON RAYOS X.

EDAD	HOMBRE	MUJER	FUMADOR	NO FUMADOR
41	+	-	+	-
50	+	-	+	-
50	+	-	+	-
51	+	-	-	+
64	+	-	-	+
67	+	-	-	+
68	-	+	-	+
71	+	-	-	+
75	+	-	-	+

TABLA II
RESULTADOS DE LA INDUCCION DE MICRONUCLEOS "IN VITRO" CON
RAYOS X.

CASOS	CÉLULAS CONTADAS	CÉLULAS NEGATIVAS	CÉLULAS POSITIVAS	CÉLULAS CON MICRONUCLEOS				TOTAL MN	DOSIS (mGy)
				1	2	3	4		
0	500	492	8	8				8	0
1	500	496	4	4				4	0.38
2	500	495	5	5				5	0.58
3	500	497	3	3				3	1.51
4	500	496	4	3	1			5	4.28
5	500	493	7	5	2			9	9.45
6	500	492	8	7		1		10	17.32
7	500	494	6	6				6	37.39
8	500	493	7	7				7	40.45
9	500	488	12	12				12	77.85
10	500	491	9	8	2			12	82.92
11	500	483	17	16		1		19	92.97
12	500	485	15	14	1			16	133.55
13	500	487	13	13				13	162.40
14	500	483	17	15	2			19	216.81
15	500	481	19	19				19	233.76
16	500	475	25	20	5			30	272.90
17	500	472	28	23	3	2		35	334.83

TABLA III
PACIENTES QUE DONARON MUESTRAS SANGUINEAS. IRRADIACION CON
RADIACION GAMMA.

EDAD	SEXO		HABITO TABAQUICO	
AÑOS	HOMBRE	MUJER	NO FUMADOR	FUMADOR
56	+	-	+	-
61	+	-	+	-

TABLA IV

RESULTADOS INDUCCION DE MICRONUCLEOS CON RADIACION GAMMA.

CASOS	CÉLULAS CONTADAS	CÉLULAS NEGATIVAS	CÉLULAS POSITIVAS	CÉLULAS CON MICRONUCLEOS				TOTA L MN	DOSIS (mGy)
				1	2	3	4		
0	500	497	3	3				3	0
1	500	493	7	7				7	13
2	500	493	7	7				7	18
3	500	492	8	8				8	72
4	500	487	13	12	1			14	104
5	500	484	16	16				16	302
6	500	483	17	15	2			19	623
7	500	480	20	20				20	852
8	500	479	21	19	2			23	1283
9	500	465	35	25	8	2		47	2628
10	500	428	72	63	9			81	4543
11	500	389	111	101	10			121	8301
12	500	316	184	114	61	6	3	266	16362

TABLA V

SERIE DE LINFOCITOS CB. Muestras tratadas no irradiadas

MUESTRAS	CELULAS CONTADAS	CELULAS POSITIVAS	CELULAS CON MN			TOTAL MN	MEDIA
			1	2	3		
Control 1	500	7	7			7	
Control 2	500	5	4	1		6	
Control 3	500	6	6.5			6.5	
Control 4	500	5	5			5	
Control 5	500	6	6.5			6.5	
							6.2
DMSO	500	4	1	2	1	8.5	
DMSO	500	8	8			8	
DMSO	500	5	4	1		6	
							7.5
Rutina	500	4	3	1		5	
Rutina	500	6	5	1		7	
Rutina	500	6	6			6	
							6
Diosmina	500	4	4			4	
Diosmina	500	5	4	1		6	
Diosmina	500	7	6	1		8	
							6
P90	500	5	3.5	2		7.5	
P90	500	3	2		1	5	
P90	500	4	4			4	
							5.5
Vitamina C	500	4	4.5			4.5	
Vitamina C	500	5	4.5	1		6.5	
Vitamina C	500	5	3	2		7	
							6

TABLA VI

SERIE DE LINFOCITOS CB. Muestras tratadas Preirradiación.

MUESTRAS	CELULAS CONTADAS	CELULAS POSITIVAS	CELULAS CON MN			TOTAL MN	MEDIA
			1	2	3		
Control 1	500	7	7			7	
Control 2	500	5	4	1		6	
Control 3	500	6	6.5			6.5	
Control 4	500	5	5			5	
Control 5	500	6.5	6.5			6.5	
							6.2
Control I- 1	500	29.5	29.5			29.5	
Control I- 2	500	25	22	2	1	29	
Control I- 3	500	31.5	31.5			31.5	
Control I- 4	500	25	21	1	1	26	
Control I- 5	500	30	29	2		31	
							29.4
DMSO	500	27	27			27	
DMSO	500	31	28	3		34	
DMSO	500	32	31	1		33	
DMSO	500	30	30			30	
DMSO	500	27	25	2		29	
							30.7
Rutina	500	27	25	2		29	
Rutina	500	15	15			15.5	
							22.25
Diosmina	500	9	9			9	
Diosmina	500	17	17.5			17.5	
							13.25
P90	500	21	18	2	1	25	
P90	500	8	8			8	
P90	500	10	10			10	
P90	500	6	5	1		7	
P90	500	12	12			12	
							12.4
Vitamina C	500	10	8	2		12	
Vitamina C	500	21	21			21	
							16.5

TABLA VII
FACTOR DE PROTECCIÓN (CB)

COMPUESTO	FP (%)	
	Preirradiación	Postirradiación
Rutina	24	18
Diosmina	54	32
DMSO	0	0
Vitamina C	44	28
P90	57	43

TABLA VIII

SERIE DE LINFOCITOS CB. Muestras tratadas postirradiación

MUESTRAS	CELULAS CONTADAS	CELULAS POSITIVAS	CELULAS CON MN			TOTAL MN	MEDIA
			1	2	3		
Control 1	500	7	7			7	
Control 2	500	5	4	1		6	
Control 3	500	6	6.5			6.5	
Control 4	500	5	5			5	
Control 5	500	6	6.5			6.5	
							6.2
Control I-1	500	29	29.5			29.5	
Control I-2	500	25	22	2	1	29	
Control I-3	500	31	31.5			31.5	
Control I-4	500	23	21	1	1	26	
Control I-5	500	29	27	2		31	
							29.4
DMSO	500	32	32			32	
DMSO	500	28	27	1		29	
							30.5
Rutina	500	22	21	1		23	
Rutina	500	23	21	2		25	
							24
Diosmina	500	18	18			18	
Diosmina	500	21	20	1		22	
							20
P90	500	15	14	1		16	
P90	500	18	18			18	
P90	500	7	5	1	1	10	
P90	500	22	22			22	
							16.5
Vitamina C	500	16	14.5	2		18.5	
Vitamina C	500	23	23.5			23.5	
							21

TABLA IX

GRUPO DE PACIENTES EN RADIODIAGNOSTICO. CARACTERISTICAS.

EDAD	SEXO		HABITO TABAQUICO	
AÑOS	HOMBRE	MUJER	NO FUMADOR	FUMADOR
21	+	-	-	+
26	+	-	+	-
41	+	-	-	+
42	+	-	+	-
46	+	-	+	-
48	+	-	-	+
50	+	-	-	+
50	+	-	-	+
50	+	-	-	+
53	+	-	+	-
54	+	-	-	+
54	+	-	-	+
54	+	-	+	-
60	+	-	-	+
60	+	-	-	+
62	+	-	+	-
64	+	-	+	-
64	+	-	+	-
66	+	-	-	+
67	+	-	+	-
68	-	+	+	-
72	+	-	+	-
77	+	-	-	+
82	-	+	+	-
84	-	+	+	-

TABLA X

EXPLORACIONES RADIOLOGICAS REALIZADAS A LOS PACIENTES.

PACIENTE	EXPLORACION
1	Arteriografía de miembro inferior izquierdo.
2	Arteriografía de miembro inferior izquierdo
3	Coronariografía.
4	Arteriografía de troncos supraaórticos.
5	Coronariografía.
6	Aortograma abdominal.
7	Coronariografía.
8	Angiograma iliofemoral.
9	Coronariografía. Hemodinámica.
10	Arteriografía de miembros inferiores.
11	Arteriografía de miembros inferiores y procedimiento dilatador terapéutico.
12	Colangio-transparieto-hepática.
13	Coronariografía.
14	Coronariografía.
15	Coronariografía.
16	Coronariografía.
17	Urografía.
18	Urografía.
19	Colangiografía trnskerh.
20	Coronariografía.
21	Coronariografía.
22	Esofagoplastia.
23	Angioplastia.
24	Arteriografía aórtica selectiva renal bilateral.
25	Aortografía.

TABLA XI

PACIENTES EN RADIODIAGNOSTICO. RECUESTO DE MICRONUCLEOS EN MUESTRAS NO IRRADIADAS (MUESTRA I)

PACIENTE	CÉLULAS CONTADAS	CÉLULAS NEGATIVAS	CÉLULAS POSITIVAS	CÉLULAS CON MICRONUCLEO			TOTAL MN
				1	2	3	
1	500	497	3	3			3
2	500	497	3	3			3
3	500	496	4	4			4
4	500	496	4	4			4
5	500	497	3	3			3
6	500	498	2	2			2
7	500	496	4	4			4
8	500	497	3	3			3
9	500	496	4	4			4
10	500	495	5	5			5
11	500	496	4	4			4
12	500	491	9	7	2		11
13	500	498	2	2			2
14	500	497	3	3			3
15	500	484	6	5	1		7
16	500	489	11	11			11
17	500	489	11	10	1		12
18	500	493	7	7			7
19	500	492	8	6	2		10
20	500	479	21	19	2		23
21	500	488	12	12			12
22	500	490	10	10			10
23	500	492	8	7		1	10
24	500	493	7	7			7
25	500	487	13	13			13

TABLA XII

PACIENTES EN RADIODIAGNOSTICO. RECUENTO DE MICRONUCLEOS EN MUESTRAS NO IRRADIADAS CON CONTRASTE RADIOLÓGICO (5%)(MUESTRA II)

PACIENTE	CÉLULAS CONTADAS	CÉLULAS NEGATIVAS	CÉLULAS POSITIVAS	CÉLULAS CON MICRONUCLEO			TOTAL MN
				1	2	3	
1	500	498	2	2			2
2	500	498	2	2			2
3	500	496	4	4			4
4	500	497	3	3			3
5	500	498	2	2			2
6	500	497	3	3			3
7	500	498	2	2			2
8	500	495	4	4			4
9	500	497	3	3			3
10	500	494	6	6			6
11	500	496	4	4			4
12	500	496	4	4			4
13	500	498	2	2			2
14	500	495	5	5			5
15	500	494	6	6			6

TABLA XIII

PACIENTES EN RADIODIAGNOSTICO. RECUENTO DE MICRONUCLEOS EN MUESTRAS IRRADIADAS "IN VITRO" DURANTE TODA LA EXPLORACIÓN RADIOLÓGICA (MUESTRA III)

PACIENTE	CELULAS CONTADAS	CELULAS NEGATIVAS	CELULAS POSITIVAS	CELULAS CON MICRONUCLEOS			TOTAL MN	DOSIS (mGy)
				1	2	3		
1	500	495	5	5			5	0.58
2	500	496	4	4			4	0.38
3	500	492	8	7	1		10	17.32
4	500	496	4	4			4	4.24
5	500	494	6	6			6	6.45
6	500	496	4	4			4	4.77
7	500	496	4	4			4	4.28
8	500	495	5	5			5	1.21
9	500	493	7	5	2		7	9.45
10	500	493	7	5	2		7	0.53
11	500	497	3	3			3	1.51
12	500	490	10	9	1		11	4.19
13	500	492	8	8			8	4.66
14	500	492	8	8			8	4.53
15	500	485	15	11	3	1	21	3.73

TABLA XIV

PACIENTES EN RADIODIAGNOSTICO.RECUENTO DE MICRONUCLEOS EN MUESTRAS IRRADIADAS "IN VIVO" DURANTE LA EXPLORACION RADIOLOGICA (MUESTRA IV).

PACIENTE	CELULAS CONTADAS	CELULAS NEGATIVAS	CELULAS POSITIVAS	CELULAS CON MICRONUCLEOS			TOTAL MN	DOSIS (mGy)
				1	2	3		
1	500	497	3	3			3	0.58
2	500	496	4	3	1		5	0.38
3	500	489	11	10	2		14	17.32
4	500	497	3	3			3	4.24
5	500	496	4	4			4	6.45
6	500	498	2	2			2	4.77
7	500	495	5	5			5	4.28
8	500	496	4	4			4	1.21
9	500	494	6	5	1		7	9.45
10	500	496	4	2	1	1	7	0.53
11	500	493	7	6	1		8	1.51
12	500	493	7	5	2		9	4.19
13	500	495	5	4	1		6	4.66
14	500	493	7	5	2		9	4.53
15	500	490	10	7	1	2	15	3.73
16	500	491	9	9			9	2.10
17	500	486	14	14			20	0.32
18	500	492	8	6	2		10	0.25
19	500	490	10	10			10	1.97
20	500	485	15	14	1		16	1.88
21	500	484	16	14	2		18	4.07
22	500	490	10	7	3		13	2.20
23	500	490	10	10			10	4.10
24	500	495	5	5			5	0.71
25	500	495	5	4	1		6	1.072

TABLA XV
PACIENTES EN MEDICINA NUCLEAR. CARACTERISTICAS.

EDAD	SEXO	
AÑOS	HOMBRE	MUJER
74	-	+
55	+	-
55	-	+
74	-	+
65	-	+
75	+	-
27	-	+
43	-	+
40	-	+
39	-	+
50	+	-
51	-	+
65	-	+
45	-	+
58	-	+
58	-	+
56	-	+
33	+	-
89	+	-
52	-	+
46	-	+
55	+	-
54	-	+
55	+	-
47	-	+
32	-	+

TABLA XIX
PACIENTES EN TERAPIA METABOLICA. CARACTERISTICAS.

EDAD	SEXO	
AÑOS	HOMBRE	MUJER
59	+	-
30	-	+
53	-	+
64	-	+
53	-	+
67	-	+
18	-	+
49	-	+
37	-	+
49	-	+
37	-	+
49	-	+
52	-	+
25	-	+
49	-	+
57	-	+
24	-	+
40	-	+
36	-	+
47	-	+
32	+	-
56	-	+
11	+	-
45	-	+
37	-	+

TABLA XVI
EXPLORACIONES RADIOLOGICAS REALIZADAS A LOS PACIENTES.

PACIENTE	EXPLORACION	RADIOFARMACO
1	Gammagrafía mamaria	MIBI-Tc ^{99m}
2	Gammagrafía paratiroidea	MIBI-Tc ^{99m}
3	Gammagrafía mamaria	MIBI-Tc ^{99m}
4	Gammagrafía mamaria	MIBI-Tc ^{99m}
5	Gammagrafía mamaria	MIBI-Tc ^{99m}
6	Gammagrafía paratiroidea	MIBI-Tc ^{99m}
7	Gammagrafía paratiroidea	MIBI-Tc ^{99m}
8	Gammagrafía ósea	HMDP-Tc ^{99m}
9	Gammagrafía paratiroidea	MIBI-Tc ^{99m}
10	Gammagrafía paratiroidea	MIBI-Tc ^{99m}
11	Gammagrafía paratiroidea	MIBI-Tc ^{99m}
12	Gammagrafía paratiroidea	MIBI-Tc ^{99m}
13	Gammagrafía mamaria	MIBI-Tc ^{99m}
14	Gammagrafía mamaria	MIBI-Tc ^{99m}
15	Gammagrafía paratiroidea	MIBI-Tc ^{99m}
16	Gammagrafía ósea	HMDP-Tc ^{99m}
17	Gammagrafía paratiroidea	MIBI-Tc ^{99m}
18	Gammagrafía paratiroidea	MIBI-Tc ^{99m}
19	Gammagrafía ósea	HMDP-Tc ^{99m}
20	Gammagrafía mamaria	MIBI-Tc ^{99m}
21	Gammagrafía paratiroidea	MIBI-Tc ^{99m}
22	Gammagrafía ósea	HMDP-Tc ^{99m}
23	Gammagrafía mamaria	MIBI-Tc ^{99m}
24	Gammagrafía ósea	HMDP-Tc ^{99m}
25	Gammagrafía ósea	HMDP-Tc ^{99m}
26	Gammagrafía paratiroidea	MIBI-Tc ^{99m}

TABLA XVII

PACIENTES EN MEDICINA NUCLEAR.RECUENTO DE MICRONUCLEOS EN MUESTRAS NO IRRADIADAS (MUESTRA I).

PACIENTE	CÉLULAS CONTADAS	CÉLULAS NEGATIVAS	CÉLULAS POSITIVAS	CÉLULAS CON MICRONUCLEO			TOTAL MN
				1	2	3	
1	500	496	4	4			4
2	500	496	4	4			4
3	500	497	3	3			3
4	500	493	7	7			7
5	500	495	5	5			5
6	500	497	3	3			3
7	500	498	2	2			2
8	500	495	5	5			5
9	500	494	6	6			6
10	500	497	3	3			3
11	500	495	5	5			5
12	500	496	4	4			4
13	500	496	4	4			4
14	500	498	2	2			2
15	500	494	6	6			6
16	500	498	2	2			2
17	500	494	6	6			6
18	500	496	4	4			4
19	500	492	2	2			2
20	500	496	4	4			4
21	500	496	4	4			4
22	500	495	5	5			5
23	500	494	6	6			6
24	500	495	5	5			5
25	500	492	8	8			8
26	500	495	5	5			5

TABLA XVIII

PACIENTES EN MEDICINA NUCLEAR. RECUENTO DE MICRONUCLEOS EN MUESTRAS IRRADIADAS (MUESTRA II).

PACIENTE	CÉLULAS CONTADAS	CÉLULAS NEGATIVAS	CÉLULAS POSITIVAS	CÉLULAS CON MICRONUCLEO			TOTAL MN
				1	2	3	
1	500	497	3	3			3
2	500	495	5	5			5
3	500	495	5	5			5
4	500	494	6	6			6
5	500	496	4	4			4
6	500	496	4	4			4
7	500	497	3	3			3
8	500	497	3	3			3
9	500	495	5	5			5
10	500	498	2	2			2
11	500	494	6	6			6
12	500	497	3	3			3
13	500	495	5	5			5
14	500	496	4	4			4
15	500	495	5	5			5
16	500	496	4	4			4
17	500	494	6	6			6
18	500	497	3	3			3
19	500	491	9	9			9
20	500	494	6	6			6
21	500	497	3	3			3
22	500	497	2	2			2
23	500	496	4	4			4
24	500	496	4	4			4
25	500	490	10	10			10
26	500	496	4	4			4

TABLA XXI

PACIENTES EN TERAPIA METABÓLICA. RECUENTO DE MICRONUCLEOS EN MUESTRAS NO IRRADIADAS (MUESTRA I).

PACIENTE	CÉLULAS CONTADAS	CÉLULAS NEGATIVAS	CÉLULAS POSITIVAS	CÉLULAS CON MICRONUCLEO			TOTAL MN
				1	2	3	
1	500	495	5	5			5
2	500	496	4	4			4
3	500	496	4	4			4
4	500	497	3	3			3
5	500	497	3	3			3
6	500	496	4	4			4
7	500	497	3	3			3
8	500	496	4	4			4
9	500	497	3	3			3
10	500	498	2	2			2
11	500	493	7	7			7
12	500	495	5	5			5
13	500	495	5	5			5
14	500	497	3	3			3
15	500	496	4	4			4
16	500	494	6	6			6
17	500	497	3	3			3
18	500	495	5	5			5
19	500	498	2	2			2
20	500	495	5	5			5
21	500	495	5	5			5
22	500	495	5	5			5
23	500	495	5	5			5
24	500	497	3	3			3
25	500	496	4	4			4

TABLA XXII

PACIENTES EN TERAPIA METABÓLICA. RECUENTO DE MICRONUCLEOS EN MUESTRAS IRRADIADAS (MUESTRA II).

PACIENTE	CÉLULAS CONTADAS	CÉLULAS NEGATIVAS	CÉLULAS POSITIVAS	CÉLULAS CON MICRONUCLEO			TOTAL MN
				1	2	3	
1	500	487	13	13			13
2	500	488	12	12			12
3	500	493	7	7			7
4	500	488	12	12			12
5	500	490	10	10			10
6	500	492	8	8			8
7	500	489	11	11			11
8	500	490	10	10			10
9	500	493	7	7			7
10	500	491	9	9			9
11	500	490	10	10			10
12	500	496	4	4			4
13	500	491	9	9			9
14	500	491	9	9			9
15	500	495	5	5			5
16	500	493	7	7			7
17	500	494	6	6			6
18	500	494	6	6			6
19	500	493	7	7			7
20	500	492	8	8			8
21	500	492	8	8			8
22	500	487	13	13			13
23	500	488	12	12			12
24	500	492	8	8			8
25	500	491	9	9			9

TABLA XX:

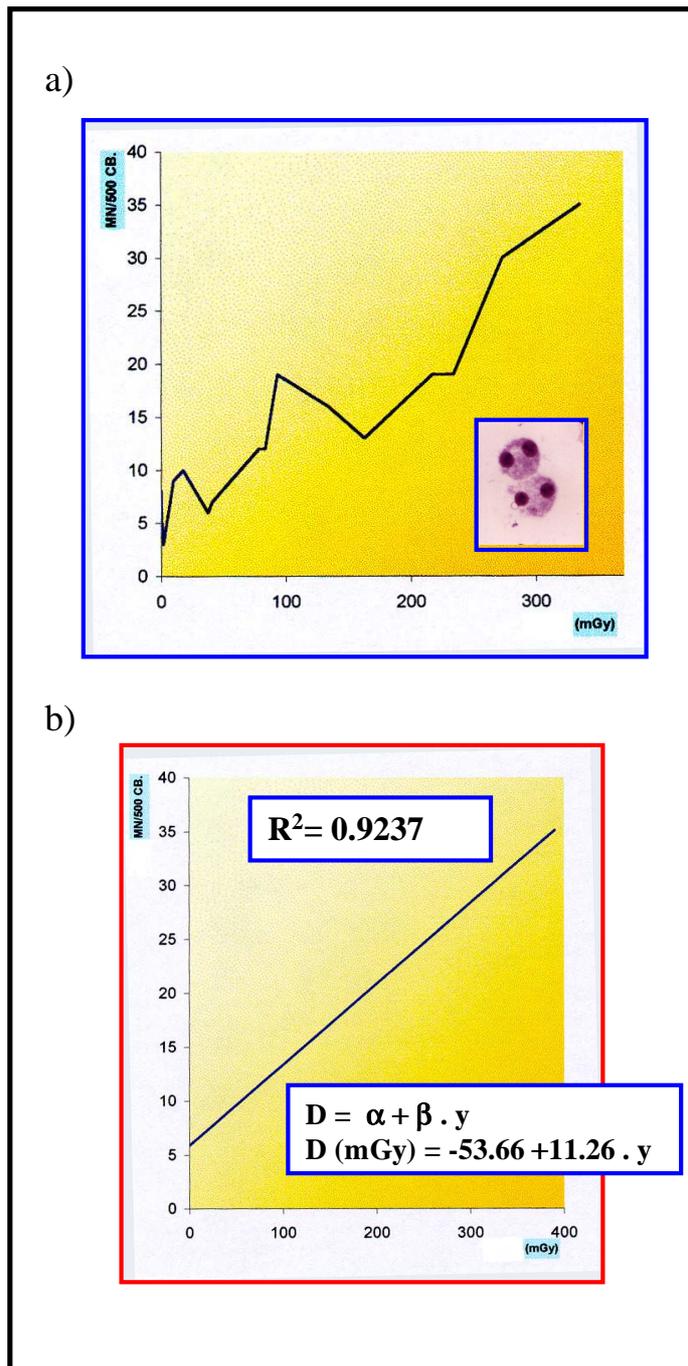
PACIENTES EN TERAPIA METABOLICA. CARACTERISTICAS

PACIENTE	PATOLOGIA
1	CARCINOMA MEDULAR
2	CARCINOMA MEDULAR
3	CARCINOMA PAPILAR
4	CARCINOMA FOLICULAR
5	CARCINOMA PAPILAR
6	CARCINOMA FOLICULAR
7	CARCINOMA PAPILAR
8	CARCINOMA PAPILAR
9	CARCINOMA PAPILAR
10	CARCINOMA PAPILAR
11	CARCINOMA MIXTO
12	CARCINOMA PAPILAR
13	CARCINOMA FOLICULAR
14	CARCINOMA PAPILAR
15	CARCINOMA PAPILAR
16	CARCINOMA PAPILAR
17	CARCINOMA FOLICULAR
18	CARCINOMA PAPILAR
19	CARCINOMA PAPILAR
20	CARCINOMA FOLICULAR
21	CARCINOMA PAPILAR
22	CARCINOMA PAPILAR
23	CARCINOMA PAPILAR
24	CARCINOMA PAPILAR
25	CARCINOMA FOLICULAR

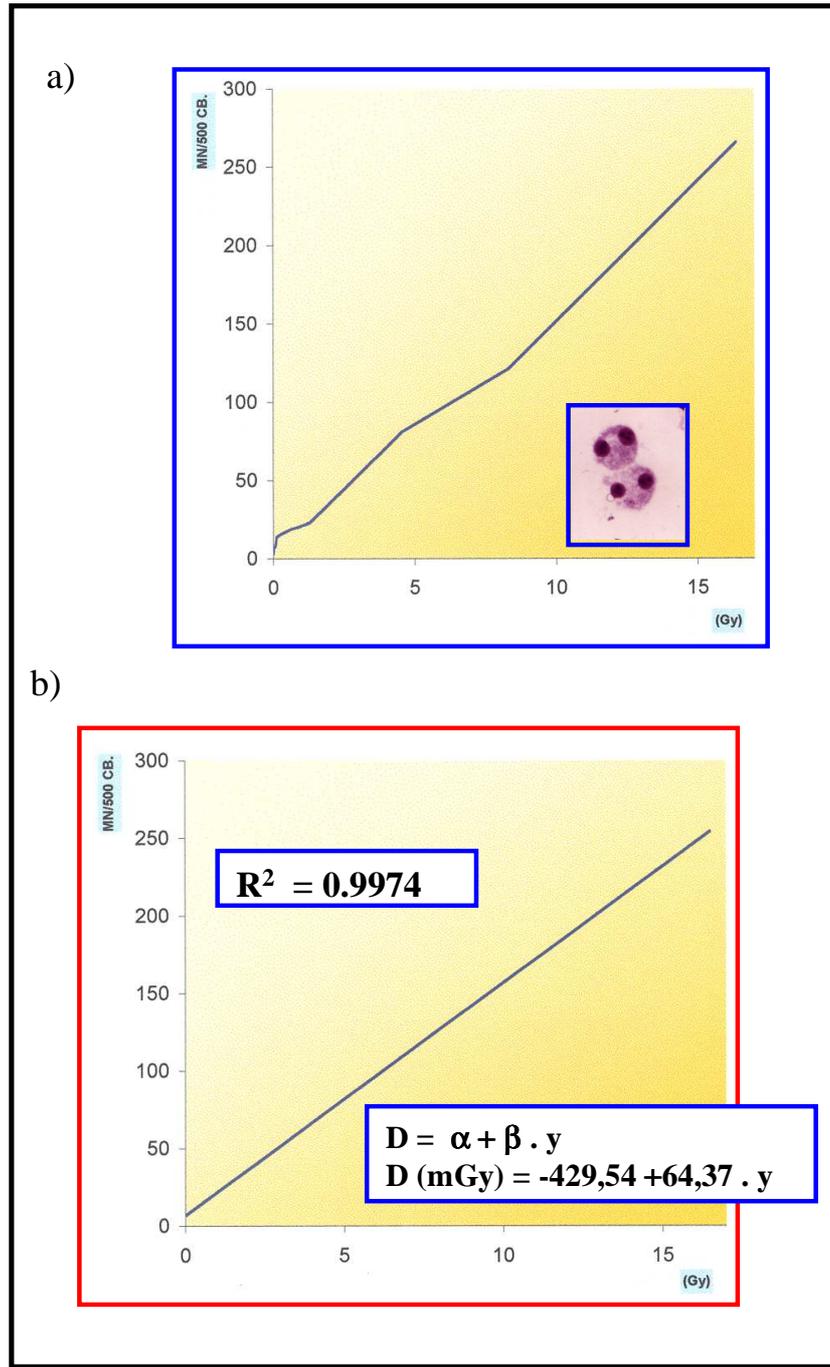
TABLA XVIII:
CORRELACION ENTRE LAS MUESTRAS DE LOS PACIENTES
SOMETIDOS A ESTUDIO RADIOLOGICO.

	TUBO I	TUBO II	TUBO III	TUBO IV
TUBO I	1.0000			
TUBO II	0.4831	1.0000		
TUBO III	0.0028 (+)	0.0003 (+)	1.0000	
TUBO IV	0.0186 (+)	0.0028 (+)	0.4827	1.0000

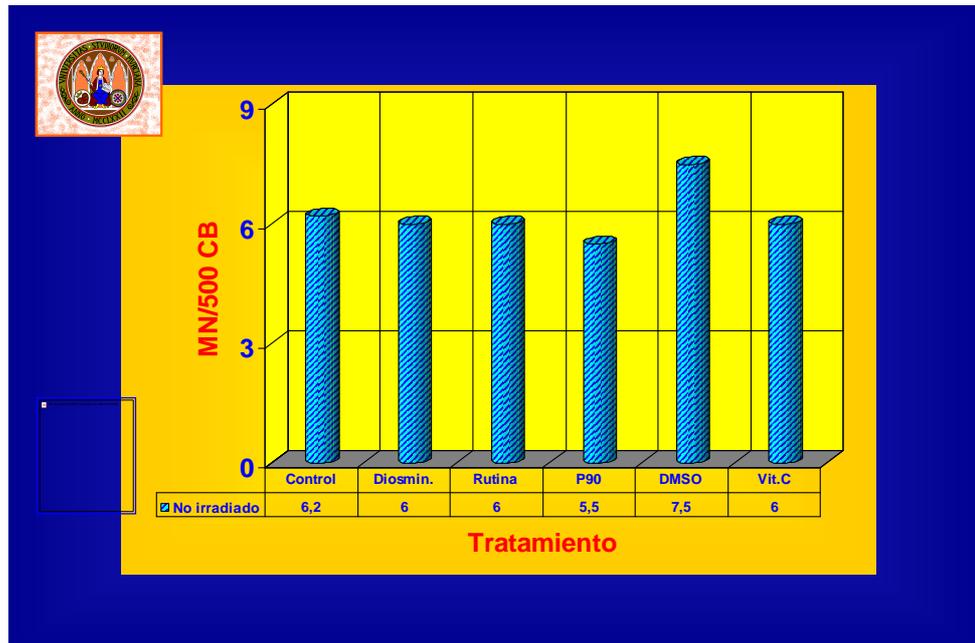
(+): Correlaciones con significación estadística.



GRÁFICA I: Serie de linfocitos CB. Curva dosis-respuesta frente a radiación X: a) Curva obtenida; b) Relación lineal determinada.



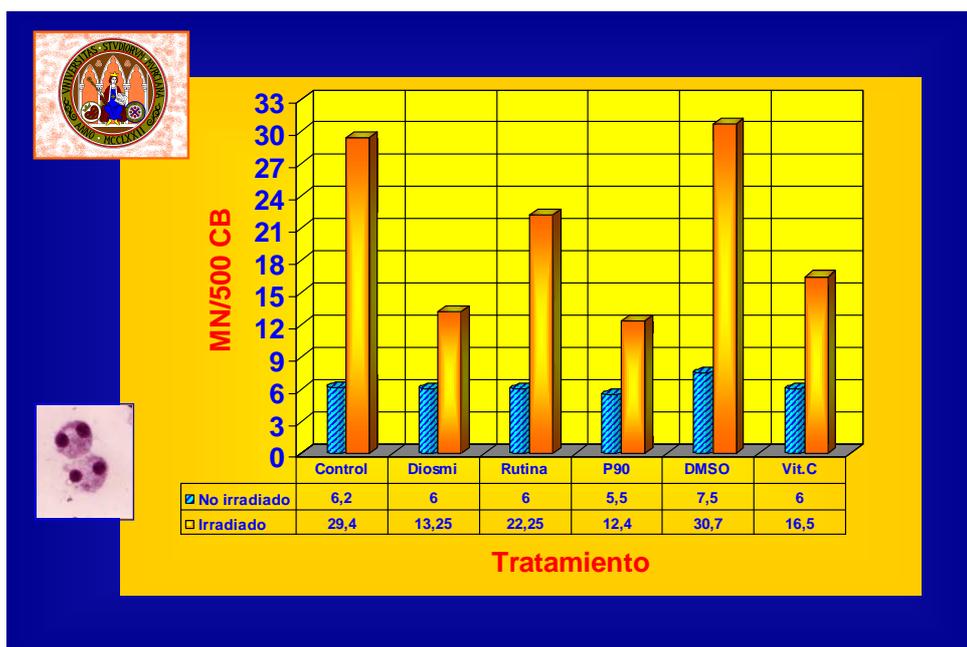
GRÁFICA II: Serie de linfocitos CB. Curva dosis-respuesta frente a radiación γ : a) Curva obtenida; b) Relación lineal determinada.



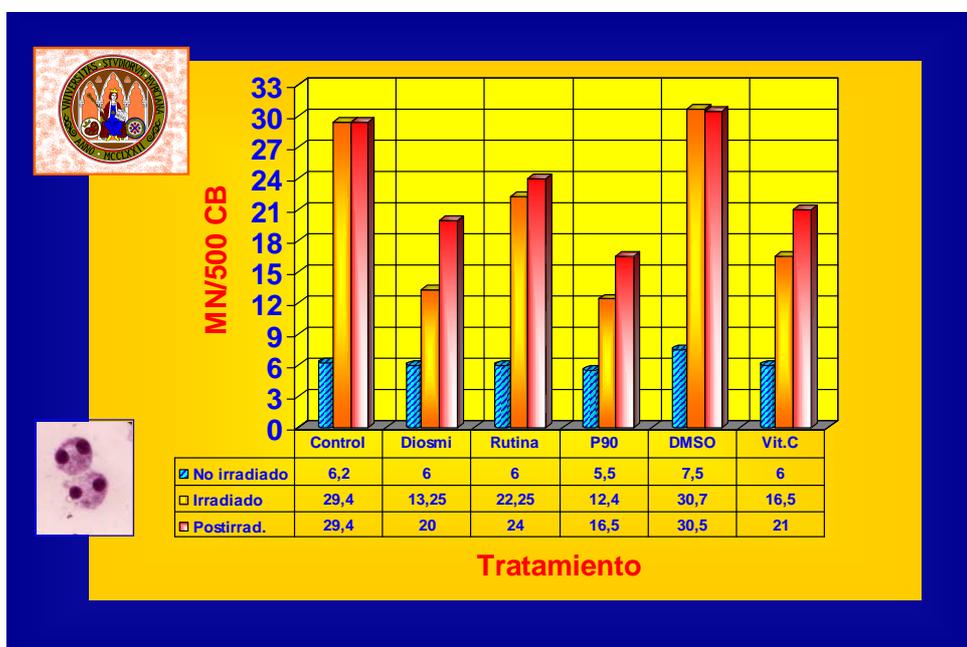
GRÁFICA III: Serie de linfocitos CB. Muestras no irradiadas tratadas con las sustancias antioxidantes ensayadas.



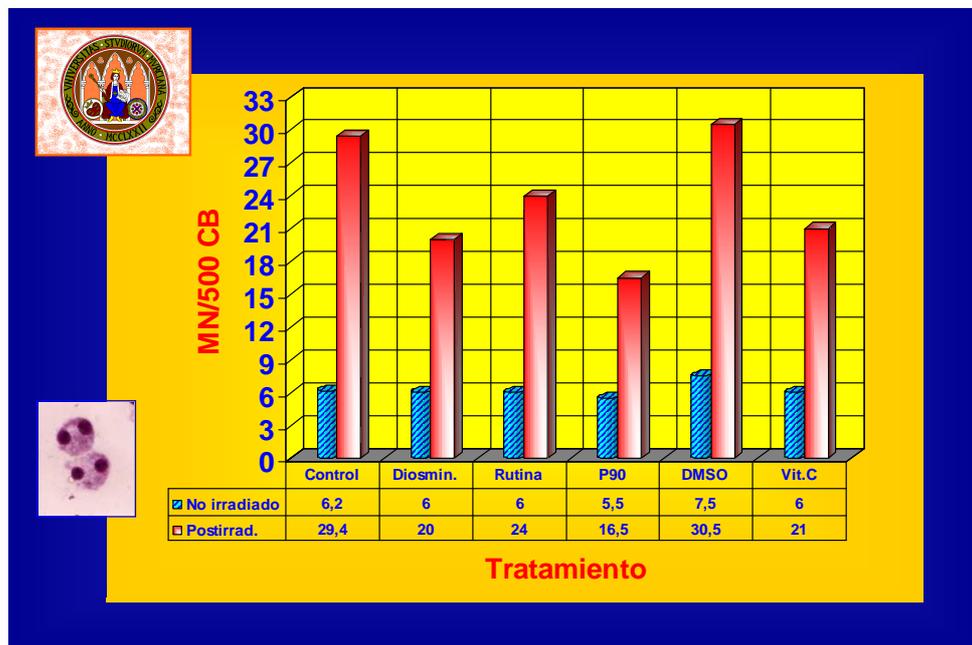
GRÁFICA IV: Serie de linfocitos CB. Muestras tratadas con las sustancias antioxidantes ensayadas. antes de ser irradiadas.



GRÁFICA V: Serie de linfocitos CB. Muestras controles e irradiadas tratadas previamente con las sustancias antioxidantes ensayadas (Tratamiento preirradiación).



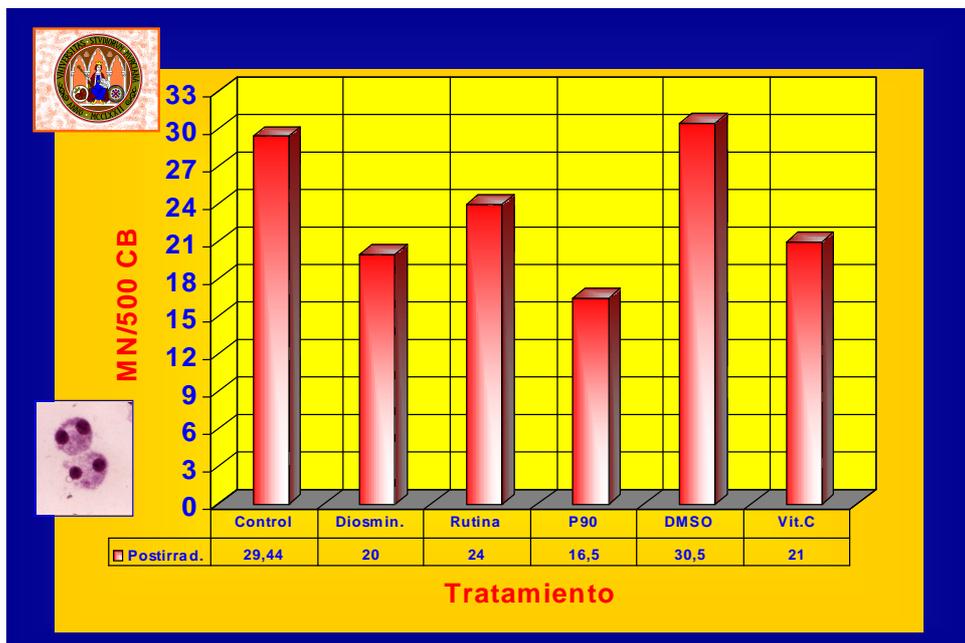
GRÁFICA VI: Serie de linfocitos CB. Muestras controles e irradiadas tratadas antes y después del tratamiento con las sustancias antioxidantes ensayadas (Tratamiento pre y postirradiación respectivamente).



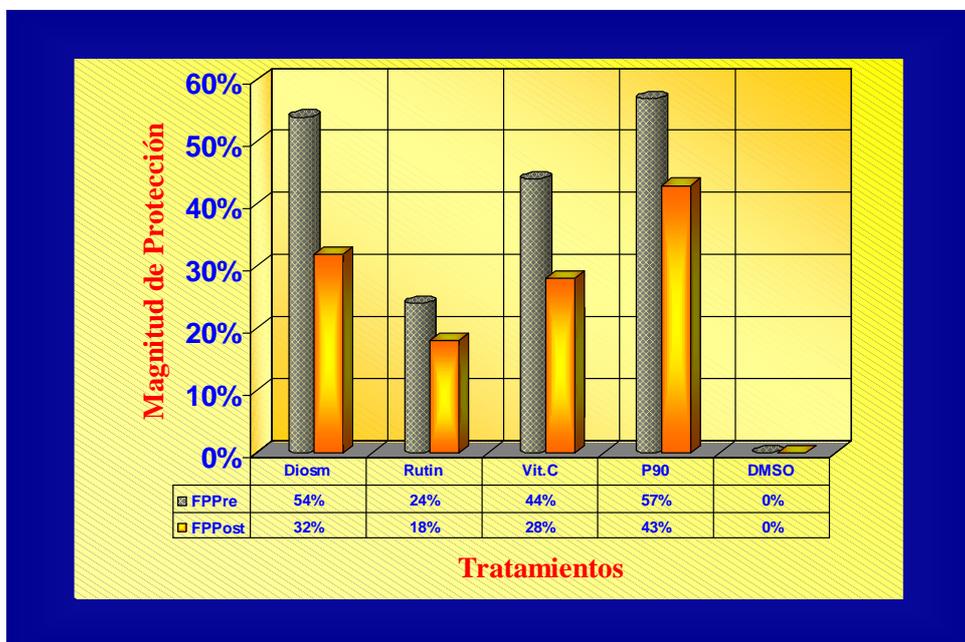
GRÁFICA VII: Serie de linfocitos CB. Muestras controles e irradiadas tratadas después con las sustancias ensayadas.



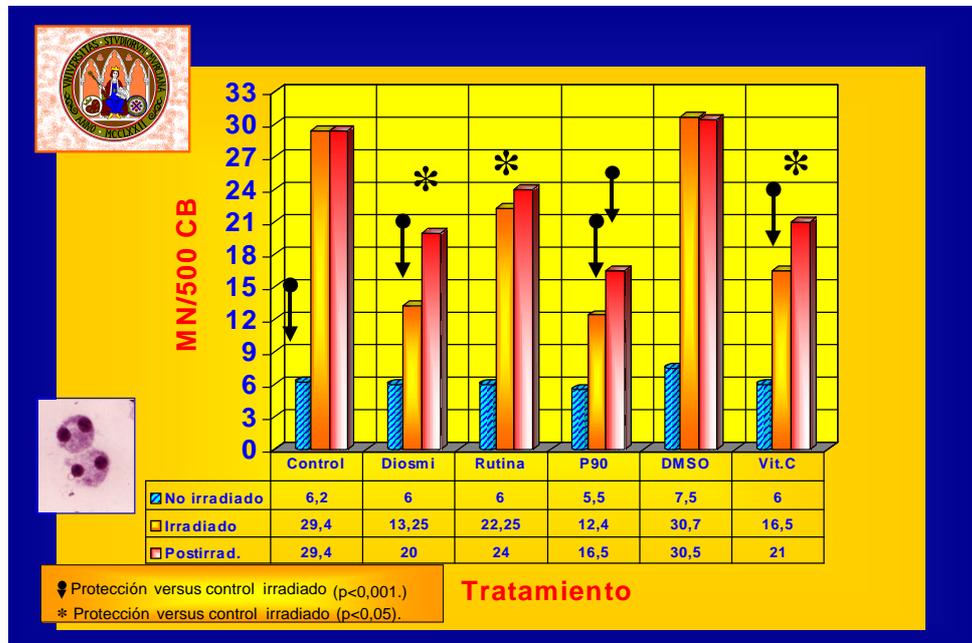
GRÁFICA VIII: Serie de linfocitos CB. Muestras con las sustancias ensayadas antes y después de ser irradiadas (tratamientos pre y postirradiación respectivamente).



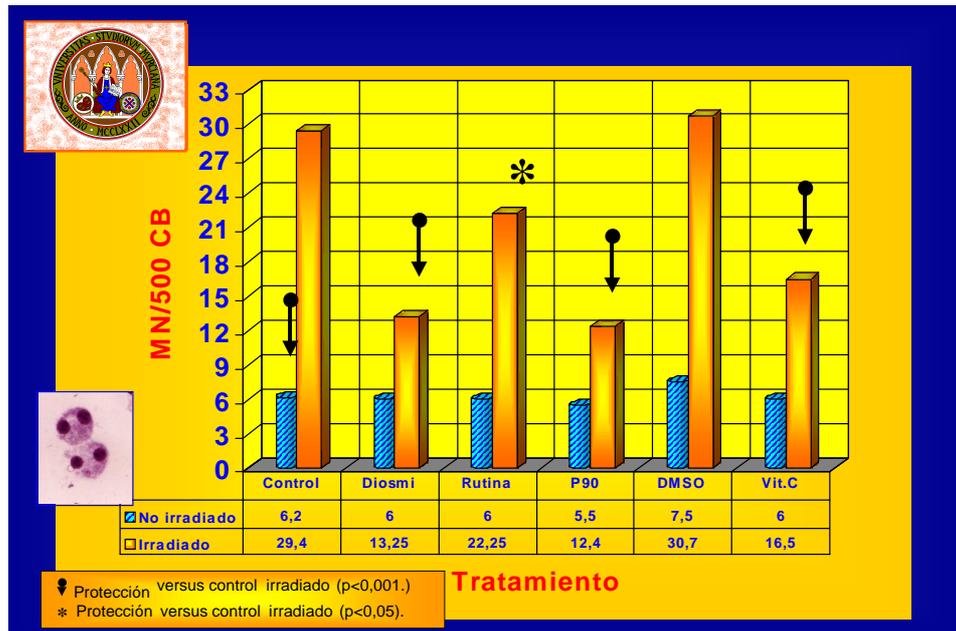
GRÁFICA IX: Serie de linfocitos CB. Muestras tratadas con las sustancias ensayadas después de ser irradiadas (tratamiento postirradiación).



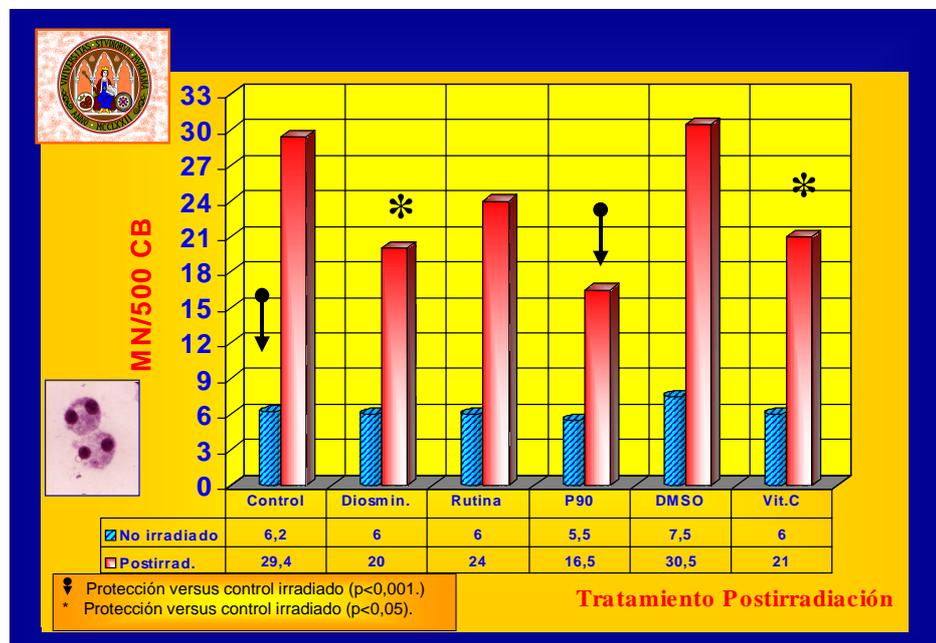
GRÁFICA X: Serie de linfocitos CB. Factor o Magnitud de Protección.



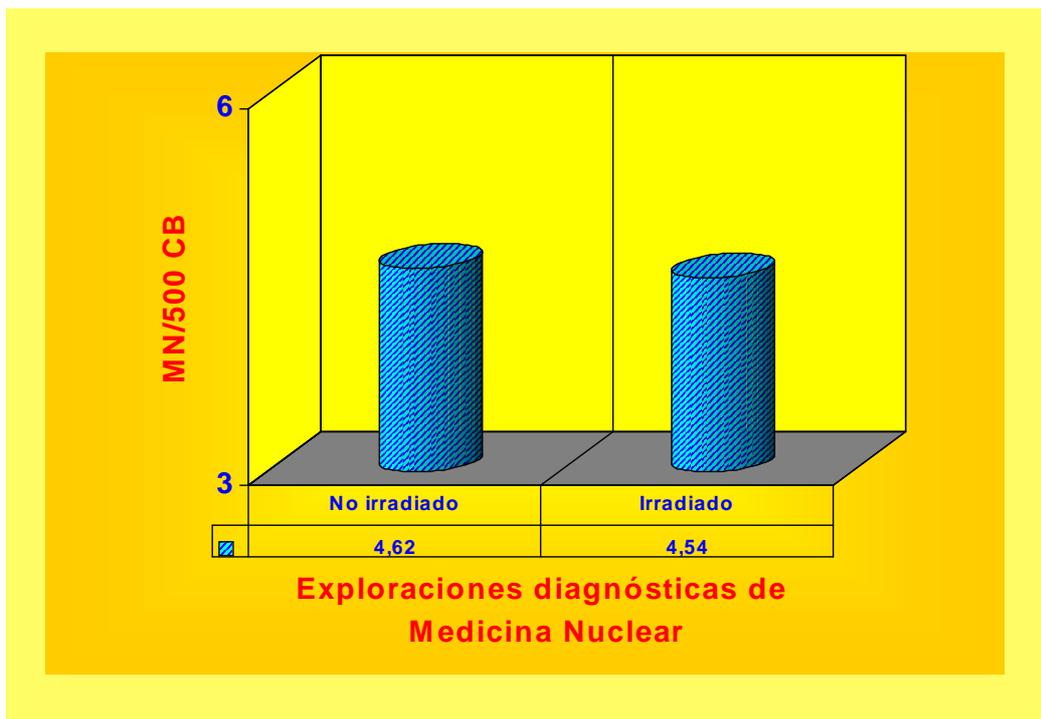
GRÁFICA XI: Serie de linfocitos CB. Significación estadística en los grupos tratados con las sustancias ensayadas (series preirradiación y postirradiación respectivamente).



GRÁFICA XII: Serie de linfocitos CB. Significación estadística en el grupo tratado con las sustancias ensayadas preirradiación (tratamiento preirradiación).



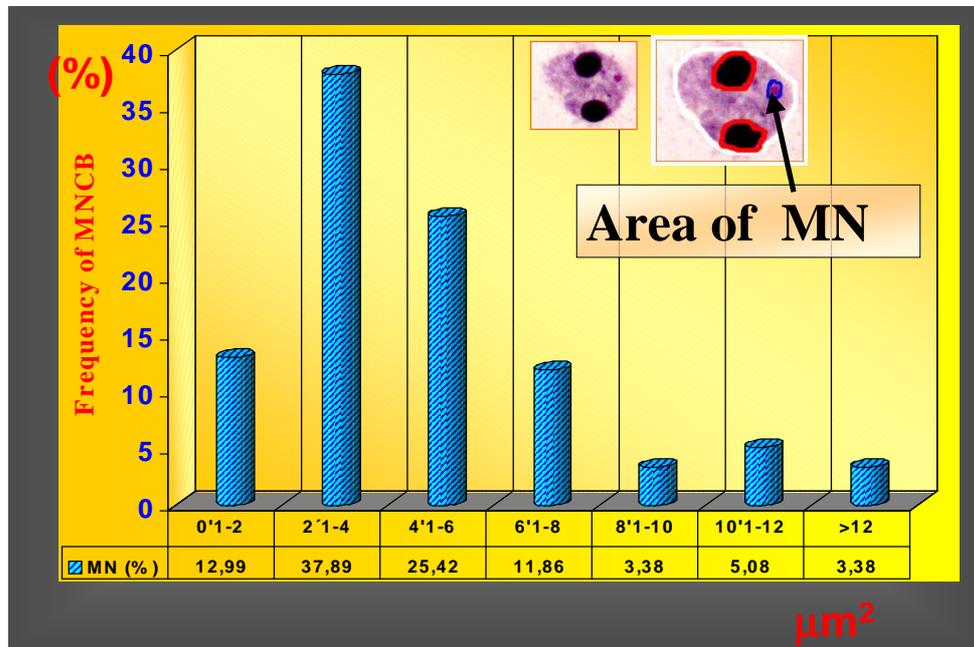
GRÁFICA XIII: Serie de linfocitos CB. Significación estadística en el grupo tratado con las sustancias ensayadas postirradiación (tratamiento postirradiación).



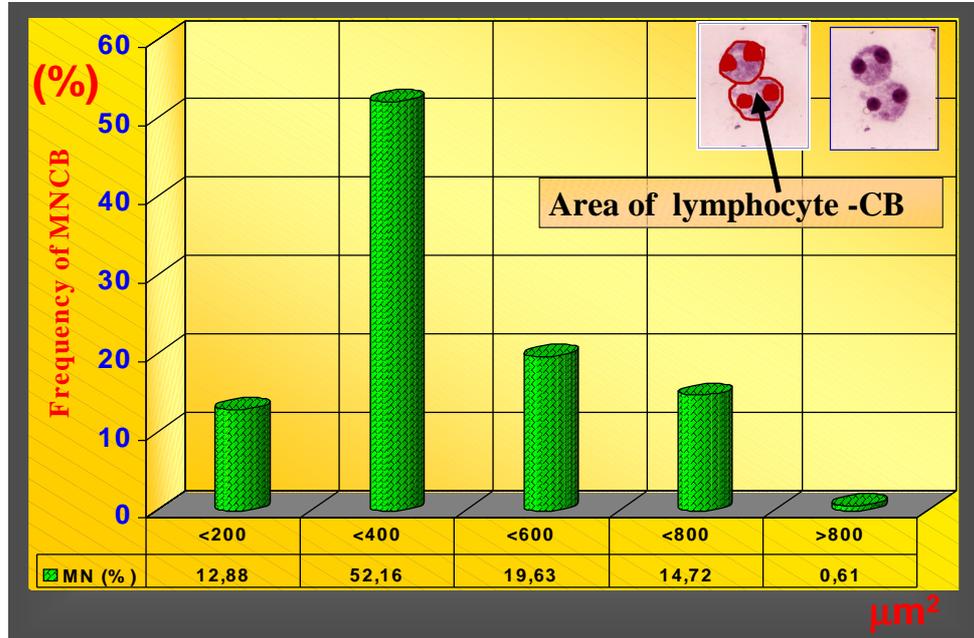
GRÁFICA XIV: Pacientes irradiados en exploraciones diagnósticas de Medicina Nuclear.



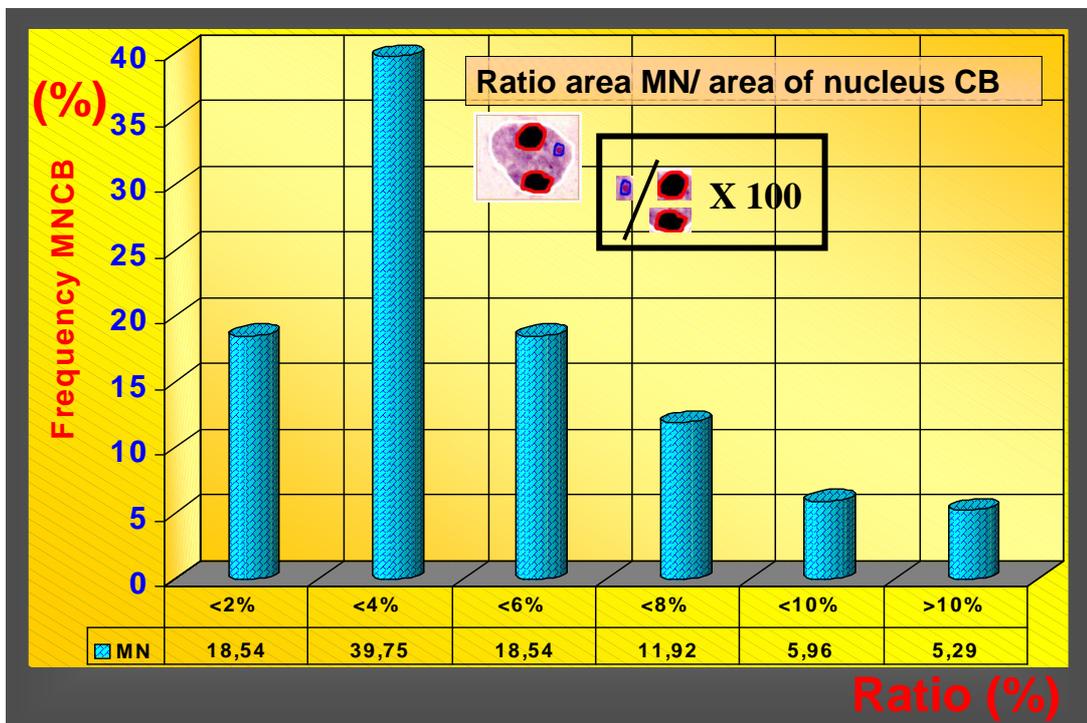
GRÁFICA XV: Pacientes irradiados en exploraciones terapéuticas de Medicina Nuclear.



GRÁFICA XVI: Serie de linfocitos CB. Morfometría: Área del micronúcleo.



GRÁFICA XVII: Serie de linfocitos CB. Morfometría: Área del linfocito que contiene al micronúcleo.



GRÁFICA XVIII: Serie de linfocitos CB. Morfometría: Relación entre las áreas del núcleo del linfocito y la del micronúcleo.

CAPITULO X.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM S.K., SARMA L. y KESAVAN P.C. (1993). Protective effects of chlorogenic acid, curcumin in P-carotene against γ -radiation-induced in vivo chromosoma damage. *Mutation Research* 303,109-112.
2. ALCARAZ, M.; ROSA, B.; GOMEZ-MORAGA, A.; TOBARRA, B.; CANTERAS, M. (1999). Ensayo de micronúcleos en linfocitos humanos irradiados durante exploraciones de radiodiagnóstico médico. I Jornadas Universitarias sobre Protección Radiológica de la Asociación de Profesores Universitarios de Radiología y Fisioterapia, Area temática de Protección Radiológica en Radiodiagnóstico, Facultad de Medicina de Málaga, 8-10 de abril de 1999, p.54.
3. ALCARAZ, M.; GOMEZ-MORAGA, A.; ROSA, B.; VICENTE, V. y CANTERAS, M. (2000). Micronucleus assay in human lymphocytes irradiated during medical radiodiagnostic exploration. Annual Meeting RADIATION RESEARCH 2000 and

Grantholders Meeting of Committee on Cancer Research, 10-12 April 2000, Churchill Hall, University of West England, Bristol, Reino Unido, p.34

4. ALCARAZ M., NAVARRO J.L., ROSA B., DATO MJ., VICENTE V., CANTERAS M., CLAVER MA (2000). Efecto de la terapia con I131 sobre la inducción de micronúcleos en linfocitos de pacientes irradiados por carcinoma de tiroides. Congreso Iberoamericano de Medicina Nuclear. VIII SPMN-XVII Alasbimn.17-21 de Octubre, Porto (Portugal), p70.
5. ALCARAZ M., ROSA B., NAVARRO JL., DATO MJ., ACEVEDO C., CANTERAS M. (2001).Citokinesis Block micronucleus in human lymphocytes: Effect of low dose radiation in vascular radiology. Conferencia internacional sobre la protección radiológica en los pacientes. 26-30 de Marzo, Málaga, p803-805.
6. ALCARAZ M., NAVARRO JL., ROSA B., DATO MJ., ACEVEDO C., CANTERAS M. CLAVER MA (2001). Capacidad genotóxica de la terapia con I131 en pacientes irradiados por carcinoma de tiroides. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Nuclear. 13-16 de Junio, Ciudad Real, p20.
7. ALCARAZ M., NAVARRO JL., ACEVEDO C., CANTERAS M. CLAVER MA (2001). Dosis equivalente corporal total tras el tratamiento con I131 en el cáncer de tiroides. XI Congreso de la Asociación Española de Radioterapia y Oncología, 3-5 de Octubre, Murcia, p105.
8. ALMASSY Z., KREPINSKY A.B., BIANCO A. y KOTELES G.J. (1987). The present state and perspectives of micronucleus assay technique in radiation protection. Applied Radiation and Isotopes, 38, 241-249.
9. ALMASSY Z., KANYAR B. y KOTELES G.J. (1986a). Frequency of micronuclei in X-irradiated human lymphocytes. International Journal Radiation Biology, 49, 719-725.

10. ALMASSY Z., KANYAR B. y KOTELES G.J. (1986b). Dose assessment through micronuclei in irradiated human lymphocytes. In Proc. European Congress of IRPA
11. ARMERO BARRANCO, D.; BERNAL PAEZ, F.; ROSA, B.; GOMEZ-MORAGA, A.; FELICES ABAD, J.M. Y ALCARAZ BAÑOS, (2000).-Test de micronúcleos en linfocitos de pacientes irradiados durante exploraciones de radiología vascular. XII Congreso Nacional de Enfermería Vascular, 31 de mayo y 1-3 de Junio, Barcelona, p.72.
12. BALASEM A.N. y ALI A.S. (1991). Establishment of dose-response relationship between dosis of Cs 137 gamma rays and frequencies of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. Mutation Research, 259, 133-138
13. BAN S. y COLOGNE J.B. (1992). X-ray induction of micronuclei in human lymphocyte subpopulations differentiated by inmunoperoxidase ataining. Radiation Research, 131, 60-65.
14. BAN S., DONOVAN M.P., COLOGNE J.B. y SAWADA S. (1991). Gamma ray and fission neutron induced micronuclei in PHA stimulated and unstimulated human lymphocytes. Journal of Radiation Research, 32, 13-22.
15. BARANOV A. E., GUSKOVA A.K., NADEJINA N.M., NUGIS V.YU. (1995). Chernobyl Experience: Biological indicators of exposure to ionizing radiation Stem Cells, 13, Suppl.1. 69-77.
16. BARBER JB., BURRIL V., SPREADBOROUGH AR., LEVINE E., WARREN C., KILTIE AE., ROBERTS SA., SCOTT D. (2000). Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. Radiother Oncol 55, 179-86.
17. BARREGARD L., HOEGSTEDT B., SCHULTZ A., KARLSSON A., SALLSTEN G., THIRINGER G. (1991). Effects of occupational exposure to mercury vapor on lymphocyte micronuclei. Scandinavian Journal of Work, Environment and Health, 17, 263-268.

18. BARTFAI E., ORSIERE T., DUFFAUD F., VILLANI P., POMPILI J., BOTTA A. (2000). Studies on the genotoxic effects of liver oil from three species of sharks collected in mediterranean waters by the means of the in vitro micronucleus test using human lymphocytes. *Ann Biol Clin* 58, 595-600.
19. BATALHA JR., GUIMARAES ET., LOBO DJ.(1999). Exploring the clastogenic effects of air pollutants in Sao Paulo (Brazil) using the tradescantia micronucleus assay. *Mutation Research* 426, 229-232.
20. BAUGNET-MAHIEU L, LEMAIRE M, UONARD ED, LÉONARD A. GERBER GB.(1994). Chromosome aberrations after treatment with radioactive iodine for thyroid cancer. *Radiat Res* 140: 429-431.
21. BENDER M.A., AWA A. A., BROOKS A.L., EVANS H.J., GROER P., LITTLEFIELD L.G., PEREIRA C., PRESTON R.J., WACHHOLZ B.W. (1988). Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mutation Research* 196, 103-115
22. BENUA RS. CICALA JE, SPAULDING SA, ET AL.(1962) The relation of radioiodine dosimetry to result and complications in the treatment of metastatic thyroid cancer. *AJR Am J Roentgenol* 77:171-182.
23. BILBAO A., PROSSER J.S., EDWARDS A.A., MOODY J.C. y LLOYD D.C. (1989). The induction of micronuclei in human lymphocytes by in vitro irradiation with alpha particles from plutonium-239. *International Journal of Radiation Biology*, 56, 287-292.
24. BLAKELY W.F., PRASANNA P.G.S., KOLANKO C.J., PYLE M.D., MOSBROOK D.M., LOATS A.S., RIPPEON T.L., LOATS H. (1995). Application of the premature chromosome condensation assay in simulated partial-body radiation exposures: evaluation of the use of an automated metaphase-finder. *Stem Cells*, 13, Suppl., 1, 223-230.
25. BOLLER K. y SCHMID W. (1970). Chemische Mutagenese beim Säuger Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als in vivo-Testsystem

Hématologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon Humangenetik, 4 35-54.

26. BONASSI S, ABBONDANDOLO A, CAMURRI L, ET AL.(1995) Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genet Cytogenet* 79: 133-135.
27. BOREHAM DR., DOLLING JA., MAVES SR., SIWARUNGSUN N., MITCHEL RE. (2000). Dose-rate effects for apoptosis and micronucleus formation in gamma-irradiated human lymphocytes. *Radiat Res* 153, 579-86.
28. BUCKTON KE, COURT BROWN WNI, SMITH PG.(1967). Lymphocyte survival in man treated with X-rays for ankylosing spondylitis, *Nature* 214: 470-473.
29. BURRIL W., BARBER JB., ROBERTS SA., BULMAN B., SCOTT D. (2000). Heritability of chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a pilot study with the lymphocyte micronucleus assay. *Int J. Radiat Biol* 76, 1617-9.
30. BURRIL W., LEVINE EL., HINDOCHA P., ROBERTS SA., SCOTT D. (2000). The use of cryopreserved lymphocytes assessing inter-individual radiosensitivity with the micronucleus assay. *Int J. Radiat Biol* 76, 375-82.
31. BUSBNELL DL, BOLES MA. KAUTMAN GE, WADAS MA, BARNES WE. (1992). Complications, sequelae and dosimetry of iodine-131 therapy for thyroid carcinoma. *JNucl Med* 33: 2214-2221.
32. CAMERON M.J. y NORMAN A. (1987). The induction of micronuclei in human lymphocytes by low doses of radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 52, 527-535.
33. CASILLO, J; BENAVENTE-GARCIA, D; DEL BAÑO, B; LORENTE, J; ALCARAZ, M Y DATO M.J. Radioprotective effects against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma rays as a function of

polymerization grade of grape seed extracts. *Journal of Medicinal Food*, 4;117-123,2001

34. CATENA C., CONTI D., TRENTA G. (2000). Micronucleus yield and colorimetric test as indicators of damage in patients' lymphocytes after ¹³¹I therapy. *Journal Nuclear Medicine* 41, 1522-1524.
35. CATENA C, VILLANI P. NASTASI R. ET AL.(1994). Micronuclei and 3AB-index in patients receiving iodine- 131 therapy. *J Nuc1 Biol Med* 38:540-547.
36. COLE R.J., TAYLOR N.A., COLE J. y ARLETT C.F. (1979). Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test. *Nature*, 277, 317-320.
37. COLE R.J., TAYLOR N.A., COLE J. y ARLETT C.F. (1981). Short term tests for transplacentally active carcinogenes. I. Micronucleus formation in fetal maternal mouse erythroblast. *Mutation Research*, 80, 141-147.
38. COUNTRYMAN P.I. y HEDDLE J.A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*, 41, 321-332.
39. COUNTRYMAN P.I., HEDDLE J.A., CRAWFORD E. (1977). The repair of X-ray-induced chromosomal damage in trisomy 21 and normal diploid lymphocytes. *Cancer Research*, 37, 52-58.
40. COUNTRYMAN P.I. y HEDDLE J.A. (1977). A true microculture technique for human lymphocytes. *Human Genetics* 35, 197-205.
41. DE VATHAIRE F, SCHLUMBERGER M, DELISLE MJ, ET AL.(1997). Leukemias and cancers following iodine131 administration for thyroid cancer. *Br J Cancer* 75: 734-739.
42. DIAZ S., FONSECA G. y FERNANDEZ J. (1990). Analysis of lymphocyte and oral mucosa cell micronuclei in cuban paint industry workers. *Hereditas*, 113, 77-80.

43. DIGUE L., ORSIERE T., DE MEO M.(1999). Evaluation of the genotoxic activity of paclitaxel by the in vitro micronucleus test in combination with fluorescent in situ hybridization of a DNA centromeric probe and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human T-lymphocytes. *Environmental Molecular Mutagen* 34, 269-278.
44. DOLPHIN G.W., LLOYD D.C. y PURROT R.J. (1973). Chromosome aberration analysis as a dosimetric technique in radiological protection. *Health Phys*, 25, 7-15.
45. DOTTORINI ME, LOMUSCIO G, MAZZUCHELLI L, VIGNATI A, COLOMBO L.(1995). Assessment of female fertility and carcinogenesis after iodine-131 therapy for differentiated thyroid carcinoma. *J Nucl Med* 36: 21-27
46. DOTTORINI ME. (1996). Genetic risk assessment after iodine-131 exposure: an opportunity and obligation for nuclear medicine (Editorial). *J Nucl Med* 37: 612-615.
47. EDMONDS CJ, SMITH T.(1986). The long-term hazards of the treatment of thyroid cancer with radioiodine. *Br J Radiol* 59:45-51,
48. EREXSON G.L., JLIGERMAN A.D., BRYANT M.F., SCONTAG M.R. y HALPERIN E.C. (1991). Induction of micronuclei by X-radiation in human, mouse and rat peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research*, 253, 193-198
49. EVANS H.J., NEARY G.J., WILLIASON F.S. (1959). The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays on vicia faba roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage. The production of micronuclei. *International Journal of Radiation Biology*, 3, 216-225.
50. EVANS H.J. y O'RIORDAN M.L. (1975). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen test. *Mutation Research*, 31, 135-138
51. EVANS HL.(1988). Mutation cytogenetics: past, present and future. *Mutat Res* 204: 355-363.

- 52.**EVANS HJ.(1986). What has been achieved with cytogenetic monitoring? In: Sorsa M, Norppa H, eds. *Monitoring of occupational genotoxicants*. New York, Alan R. Liss, 3-23.
- 53.**FENECH M. y MORLEY A.A. (1985a). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 147, 29-36.
- 54.**FENECH M. y MORLEY A.A. (1985b). The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutation Research*, 148, 99-105.
- 55.**FENECH M. y MORLEY A.A. (1986). Cytokinesis block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, 161, 193-298.
- 56.**FENECH M. (2000). A mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis* 15, 329-36.
- 57.**FERGUSON L.R., MORCOMBE P. y TRIGGS C.N. (1993). The size of cytokinesis-blocked micronuclei in human peripheral blood lymphocytes as a measure of aneuploidy induction by Set A compounds in the eeg trial. *Mutation Research*, 287, 101-112.
- 58.**FLOYD y CASSONI. (1994). Intrinsic Radiosensitivity of Adult and Cord Blood Lymphocytes as Determined by the Micronucleus Assay.
- 59.**FUCIC A., MARKUCIC D., MIJIC A., JAZBEC AM. (2000). Estimation of genome damage after exposure to ionizing radiation and ultrasound used in industry. *Environ Mol Mutagen* 36, 47-51.
- 60.**GARAJ-VRHOAC V., FUCIC A., HORVAT D. (1992). The correlation between the frequency of micronuclei and specific chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to microwave radiation in vivo. *Mutation Research*, 281, 181-186.

61. GARAJ-VRHOVAC V., KOPJAR N. (1999). Incidence of micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes of medical personnel occupationally exposed to ultrasound. *Neoplasma* 46, 377-83.
62. GARAJ-VRHOVAC V., KOPJAR N. (2000). Cytogenetic monitoring of cardiology unit hospital workers exposed to Doppler ultrasound. *J Appl Toxicol* 20, 259-64.
63. GIL OM., OLIVEIRA NG., RODRÍGUEZ AS., LAIRES A., FERREIRA TC., LIMBERT E., RUEFF J. (2000). No evidence of increased chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes from nonfamilial thyroid cancer patients prior to radiotherapy. *Cancer Genet Cytogenet* 123, 55-60.
64. GRAWE J., ZETTERBERG G., AMNEUS H. (1993). DNA content determination of micronucleated polychromatic erythrocytes induced by clastogens and spindle poisons in mouse bone marrow and peripheral blood. *Mutagenesis* 8: 249-255.
65. GREENSTOCK C.L., MAVES S.R. (1995). Fluorescence lifetime studies of AND structure in gamma-irradiated lymphocytes. Abstracts, Int. Congr. Radiat. Res., Wurzburg. P30,15.
66. GREEN LM., MURRAY DK., BANT AM., KAZARIANS G., MOYERS MF., NELSON GA., TRAN DT. (2001). Response of thyroid follicular cells to gamma irradiation compared to proton irradiation .I. Initial characterization of DNA damage, micronucleus formation, apoptosis, cell survival, and cell cycle phase redistribution. *Radiation Research* 155, 32-42.
67. GREINERT R., DETZLER E., VOLKMER B., HARDER D. (1995). Kinetics of the formation of chromosome aberrations in x-irradiated human lymphocytes: analysis by premature-chromosome condensation with delayed fusion. *Radiat. Res.*, 144, 190-197.
68. GOMEZ-ARROYO S., DIAZ-SANCHEZ Y., MENESES-PEREZ MA., VILLALOBOS-PIETRINI R., DE LEON-RODRIGUEZ J. (2000). Cytogenetic

biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutation Research* 466, 117-24.

- 69.** GUNDY S., KATZ N., FÜZY M., ÉSIK O.(1996). Cytogenetic study of radiation burden in thyroid disease patients treated with externa irradiation or radioiodine. *Mutat Res* 360: 107-113.
- 70.** GUNTER HH., JUNKER D., SCHOBER O., et AL.(1987) Dosimetry of the hematopoietic system in radioiodine therapy fo thyroid cancer. *Strahlentherapie und Onkologie*, 166:185-191.
- 71.** GUTIERREZ S., CARBONELL E., GALOFRE P.(1999). Cytogenetic damage after 131-iodine treatment for hyperthyroidism and thyroid cancer. *European Journal Nuclear Medicine* 26, 1589-1596.
- 72.** HAGMAR L. BROER A, HANSTEEN I-L, et AL.(1994). Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damaae. *Cancer Res* 54: 2919-2922.
- 73.** HALL P, BOICE JD, BERG G. ET AL.(1992). Leukaernia incidence after iodine-131 exposure. *Lancet* 340: 1-4.
- 74.** HALL EJ.(1994). Repair of radiation damage and dose-rate effect. In: Hall EJ, ed. *Radiobiology for the radiologist*. Philadelphia: JB Lippincott 107-131.
- 75.** HALL S.C. y WELLS J. (1988). Micronuclei in human lymphocytes as a biological dosemeter: preliminary data following beta irradiation in vitro. *Journal Radiology Protection* 8, 97-101.
- 76.** HAMILTON C., POTTEN C. (1995). Hair cortical cell counts (HCCC) as an indicator of radiation dose and sensitivity in humans. Abstracts, *Int. J. Radiat. Res.*, Wurzburg, P30,24
- 77.** HAYASHI M., SOFUNI T. y ISHIDATE M. (1983). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Research*, 120, 241-243.

- 78.** HAYASHI M., MORITA T., KODAMA Y., SOFUNI T. y ISHIDATA M. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*, 245, 245-249.
- 79.** HAYNIE TP, VASSILOPOULOU-SELLIN R. (1995). How safe for the patient is iodine-131 therapy for differentiated thyroid carcinoma? (Editorial). *J Nucl Med* 36: 7-28.
- 80.** HE JL., JIN HY., JIN LF., GAO SY. (2000). Monitoring of human exposure to radiation with the binucleated lymphocyte micronucleus assay. *Biomed Environ Sci* 13, 32-6.
- 81.** HEDDLE J.A. (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*, 18, 187-190.
- 82.** HEDDLE J.A. y CARRANO A.V. (1977). The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutation Research*, 44, 63-69.
- 83.** HEDDLE J.A. y SALOMONE M.F. (1981). Chromosomal aberrations and bone marrow toxicity. *Environ. Health Perspect*, 39, 23-27.
- 84.** HEDDLE J.A., BLAKEY D.H., DUNCAN A.M.V., GOLDBERG M.T., NEWMARK H., WARGOWICH M.J. y BRUCE W.R. (1982). Micronuclei and related nuclear anomalies as a short-term assay for colon carcinogens. *Banbury Rep.*, 13, 367-371.
- 85.** HEIMERS A. (1999). Cytogenetic analysis in human lymphocytes after exposure to simulated cosmic radiation which reflects the inflight radiation environment. *Int J Radiat Biol* 75, 691-8.
- 86.** HEIMERS A. (2000). Chromosome aberration analysis in Concorde pilots. *Mutation Research* 467, 169-176.

- 87.**HOGSTEDT B. (1984). Micronuclei in lymphocytes which preserve cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. *Mutation Research*, 130, 63-72.
- 88.**HOGSTEDT B. y KARLSSON A. (1985). The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutation Research*, 156, 229-232.
- 89.**HOFFMANN G.R., COLYER S.P. y LITTLEFIELD L.G. (1993a). Induction of micronuclei by bleomycin in G0 human lymphocytes. II Potentiation by radioprotectors. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 21, 136-143.
- 90.**HOFFMAN G.R., COLYER S.P. y LITTLEFIELD L.G. (1993b). Induction of micronuclei by bleomycin G0 human lymphocytes. I Dose-response and distribution. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 21, 130-135.
- 91.**HOGSTEDT B., HOLMEN A., KARLSSON A., RAIHLE G., NILLIUS K. y VESTLUND K. (1991). Gasoline pump mechanics had increased frequencies and sizes of micronuclei in lymphocytes stimulated by pokeweed mitogen. *Mutation Research*, 263, 51-55.
- 92.**HOGSTEDT B., GULLBERG B., HEDNER K., KOLNING A.M., MITELMAN F., SKERFVING S. y WIDERGREN B. (1983). Chromosome aberration and micronuclei in bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes in humans exposed to ethylene oxide. *Hereditas* 98, 105-113.
- 93.**HUBER R., STRENG S. y BAUCHINGER M. (1983). The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. *Mutation Research*, 111, 185-193.
- 94.**HUBER R. y BAUCHINGER M. (1990). Development and perspectives of the human lymphocytes micronucleus assay. *Mutagen Research*, 1, 89-104.
- 95.**ISKANDAR O. (1979). An improved method for the detection of micronuclei in human lymphocytes. *Stain Technol*, 54, 221-223.

- 96.** JAGETIA GC., ARUNA R.(2000). Effect of acyclovir on the radiation-induced micronuclei and cell death. *Mutation Research* 469, 9-21.
- 97.** JOKSIC G., PAJOVIC SB., STANKOVIC M., PEJIC S., KASAPOVIC J., CUTTONE G., CALONGHI N., MASOTTI L., KANAZIR DT. (2000). Chromosome aberrations, micronuclei, and activity of superoxide dismutases in human lymphocytes after irradiation in vitro. *Cell Mol Life Sci* 57, 842-50.
- 98.** JOSKSIC G., STANKOVIC M., VASIC V., CAKAR M., JOKANOVIC M. (2000). Influence of ribavirin on the micronucleus formation and in vitro proliferation of human lymphocytes. *Neoplasma* 47, 283-7.
- 99.** KAZAKOV VS, DEMIDCHIK ER ASTAKHOVA LN.(1992) Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature* 359: 21-22.
- 100.** KHADZMIDEDOVA V. (1989). Frequency of micronuclei in lymphocytes in vitro gamma irradiated human peripheral blood. *Radiobiologia Radiotherapia*, 30, 157-161.
- 101.** KIM S.H., CHO C.K., KIM T.H., YOO S.Y., KOH K.H. y YUN H.G. (1993). Frequency of micronuclei in lymphocytes following gamma and fast neutron irradiations. *Anticancer Research*, 13, 1587-1591.
- 102.** KIRSCH-VOLDERS M., FENECH M. (2001). Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/ apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis* 16, 51-58
- 103.** KIRSCH-VOLDERS M., SOFUNI T., AARDEMA M., ALBERTINI S., EASTMOND D., FENECH M., ISHIDATE M., LORGE E., NORPPA H., SURRALLES J., VON DER HUDE W., WAHATA A. (2000). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Environ mol mutagen* 35, 167-72.
- 104.** KOLBER M.A. (1992). Human cytotoxic T lymphocytes and activated peripheral blood lymphocytes enhance cytochalasin B induced DNA fragmentation of indicator Bystander cells. *Cellular Immunology*, 139, 208-217.

- 105.** KORMOS C. y KOTELES G.J. (1988). Micronuclei in X-irradiated human lymphocytes. *Mutation Research*, 199, 31-35.
- 106.** KOTELES G.J., LELIK F., SZTANYIK B.L. (1987). Thermography in diagnosis of radiation injury. *Thermology*, 2, 584-586.
- 107.** KOTELES G.J., BERCES J., KORMOS Cs., HORVATH Gy (1993). Detection of scavenger effects by micronucleus assay in human lymphocytes, in vitro in "Role of Free Radicals in Biological Systems" eds Feher I. Akademiai Kiado, Budapest, 149-159.
- 108.** KOTELES G.J., BENKO I. (1994). Thermography in radiation injuries. *Thermologie Osterreich*, 4, 55-65.
- 109.** KREPINSKY A.B. y HEDDLE J.A. (1983). Micronuclei as rapid and inexpensive measure of radiation induced chromosomal aberrations. En: *Radiation Induced Chromosomal Damage in Man* (Eds. Ishihara T. y Sasaki m.s.), Alan R. Liss Ins., New York, p. 93-109.
- 110.** KRISHNA G., FRIEDLER R. y THEISS J.C. (1992). Simultaneous evaluation of clastogenicity, and eugenecity and toxicities in the mouse micronucleus assay using immunofluorescence. *Mutation Research*, 282, 159-167.
- 111.** KUDYNSKY R., KUDYNSKA J., BUCKMASTER H.A. (1994). The decay constant for irradiated human hair using EPR spectroscopy. *Appl. Radiat. Isot.*, 45, 645-650.
- 112.** LAHDETIE J. y PARVINEN M. (1981). Meiotic micronuclei induced by X-rays in early spermatids of the rat. *Mutation Research*, 81, 103-107.
- 113.** LAHDETIE J. (1985). Analysis of micronuclei in human early spermatids in the ejaculate of smokers and nonsmokers. En: *Proc. Conference Environ Mutagen Society*, Helsinki, p. 372-376.
- 114.** LASNE C., GU Z.W., VENEGAS W. y CHROURONLINKOV I. (1984). The in vitro micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by

mutagen-carcinogens: comparison with the in vitro sister-chromid exchange assay. *Mutation Research*, 130, 273-275.

115. LAZUTKA J.R. (1995). Increased frequency of sister chromatid exchanges in lymphocytes of Chernobyl clean-up workers. *Int. j. Radiat. Biol.*, 67, 671-676.
116. LEDEBUR VON M. y ACHMID W. (1973). The micronucleus test. Methodological aspects. *Mutation Research*, 19, 109-117.
117. LEE T., BRIEN K., EAVES GS., CHRISTIE KI., VARGA L. (1999). Effect of blood storage on radiation-induced micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Research* 444, 201-206.
118. LENARZYK M.y SLOWIKOWSKA M. (1995). The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from X-ray-exposed mice. *Mutation Research* 335, 229-234.
119. LIKHTAREV IA, SOBOLEV BG, KAIRO IA, ET AL.(1995). Thyroid cancer in the Ukraine. *Nature* 375: 365.
120. LIMING S. (1985). The micronucleus test of immature cell in ejaculated human sperm. En: *Proc. Conference Environ Mutagen Society*, Stockholm, p. 236.
121. LIVINSTON GK. FOSTER AE. ELSON HR.(1993). Effect of in vivo exposure to iodine-131 on the frequency and persistence of micronuclei in human lymphocytes. *J Toxicol Environ Health* 40:367-375.
122. LOHMAN P.H.M., COX R., CHADWICK K.H. (1995). Role of molecular biology in radiation biology. *Int. J. Radiat. Biol.*, 68, 331-340.
123. LUCAS J.N., AWA A., STRAUME T., POGGENSEE M., KODAMA Y., NAKANO M., OHTAKI K., WEIER H.U., PINKEL D., GRAY J., LITTLEFIELD L.G. (1992). Rapid translocation frequency analysis in humans decade after exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 62, 53-63.

- 124.** LUCERO L., PASTOR S., SUAREZ S., DURBAN R., GOMEZ C., PARRON T., CREUS A., MARCOS R. (2000). Cytogenetic biomonitoring of Spanish green house workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation Research* 464, 255-262.
- 125.** M'KACHER R, LÉGAL J-D. SCHIUNIBERGER M, ET AL.(1997). Sequential biological dosimetry after a single treatment with iodine131 for differentiated thvroid carcinorna. *J Nucl Med* 38:377-380.
- 126.** MA T.H. (1979). Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of Tradescantia-A promising mutagen test system. *Mutation Research*, 64, 307-311.
- 127.** MA T.H. (1981). Tradescantia-micronucleus bioassay and pollen tube chromatide aberrations test for in vitro monitoring and mutagen sceening. *Environ Health Perspectives*, 37, 85-87.
- 128.** MA T.H., HARRIS M.M., ANDERSON A., AHMED I., MAHAMMAD K., BARE J.L. y LIN G. (1984). Tradescantia micronucleus test/Trad-MCN/ on 140 health related agents. *Mutation Research*, 138, 157-159.
- 129.** MACGREGOR J.T., WEHR C.M. y GOULD D.H. (1980). Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. *Environnement Mutagen*, 2, 509-511.
- 130.** MAEKI-PAAKKANEN J., WALLEES S., OSTERMAN-GOLKAR S. y NORPPA H. (1991). Single-strand breaks, chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges, and micronuclei in blood lymphocytes of workers exposed to styrene during the production of reinforced plastics. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 17, 27-31.
- 131.** MALUF SW., ERDTMANN B., (2000). Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 471, 21-27.

- 132.** MARTELLI A., ROBBIANO L., COSSO M., PERRONE C. (2000). Comparison of micronuclei frequencies in mono-, bi-and poly-nucleated lymphocytes from subjects of a residential suburb and subjects living near a metallurgical plant. *Mutation Research* 470, 211-219.
- 133.** MAVOURNIN K.H., BLAKEY D.H., CIMINO M.C., SALOMONE M.F. y HEDDLE J.A. (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood, a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 239, 29-80.
- 134.** MCEWAN AC.(1977). Absorbed doses in the marrow during I-131 therapy. *Br J. Radiol*, 50: 329-331.
- 135.** MAZUR L. (1995a). Induction micronucleated erythrocytes by MEA, AET, WR-2721 and X-rays. *Mutation Research* 334, 317-322.
- 136.** MAZUR L. (1995b). Frequency of Micronuclei in mouse peripheral blood erythrocytes following WR-2721 application and X-Irradiation. *Folia Biologica (Kraków)*, 43, 3-4.
- 137.** MIGLIORE L., GUIDOTTI P., FAVRE C., NARDI M., SESSA M.R. y BRUNORI E. (1991). Micronuclei in lymphocytes of young patients under antileukemic therapy. *Mutation Research*, 263, 243-248.
- 138.** MITCHELL J.C. y NORMAN A. (1987). The induction of micronuclei in human lymphocytes by low doses of radiation. *International Journal Radiation Biology* 52, 527-535.
- 139.** MORALES RAMIREZ P., VALLARINOKELLY T., MERCADER MARTINEZ J., RODRIGUEZ-REYES R. (1994). Induction of micronuclei by acute and chronic exposure in vivo to gamma rays in murine polychromatic erythrocytes. *Mutation Res.* 341: 47-55.
- 140.** MORIKAWA K., MORIKAWA S., IMAI K. y OSEKO F. (1991). Regulation of lymphocyte blastogenesis and antibody production by soluble factor released by a human B-lymphoblastoid cell line. *Citokine*, 3, 609-610.

141. MÜLLER W-U, NÜSSE M, MILLER BM, SLAVOTINEK A. VIAGOI S, STREFFER C.(1996). Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. *Mutat Res* 366: 163-169.
142. NAGAYAMA J., NAGAYAMA M. y MASUDA Y. (1993). Frequency of micronuclei induced in cultured lymphocytes by highly toxic organochlorine congeners. *Fuknoka Acta Medica*, 84, 189-194.
143. NATARAJAN AT, BOEI JJWA, DARROUDI F, ET AL.(1996). Current cytogenetic methods for detecting exposure and effects of mutagens and carcinogens. *Environ Health Perspect* 104 [Suppl 3]: 445-448.
144. NOMAN A. SASAKI MS. OTTOMAN RE, FINGERHUT AG.(1965). Lymphocyte lifetime in women. *Science* 147:745.
145. NORMAN A., ADAMS F.H., RILEY R.F. (1978). Cytogenetic effects of contrast media and triiodobenzoic acid derivates in human lymphocytes. *Radiology* 129, 199-203.
146. NORMAN A., COCHRAN S., BASS D. y ROE D. (1984). Effects of age, sex and diagnostic X-rays on chromosome damage. *International Journal of Radiation Biology*, 46, 317-321.
147. NORMAN A., BASS D. y ROE D. (1985). Screening human populations for chromosome aberrations. *Mutation Research*, 143, 155-160.
148. NUSSE M. y KRAMER J. (1984). Flow cytometric analysis of micronuclei found in cells after irradiation. *Cytometry*, 5, 20-25.
149. NORMAN A., COCHRAN ST., SAYRE JW. (2001). Meta-analysis of Increases in Micronuclei in Peripheral Blood Lymphocytes after Angiography or Excretory Urography. *Radiat Res* 155, 740-3.
150. OBE G., VOGT H.J., MADLE S., FAHNING A., HELLER W.D. (1982). Double-bind study on the effect of cigarette smoking on the chromosomes of human peripheral blood lymphocytes in vivo. *Mutation Research* 92, 309-319.

151. OTTESEN J.(1954). On age of human white cells in peripheral blood. *Acta Physiol Scand* 32:75-93
152. PACINI F, GASPERI M, FUEAZZOLA L, ET AL.(1994). Testicular function in patients with differentiated thvroid carcinoma treated with radioiodine. *J Nucl Med* 35: 1418-1422.
153. PELEVINA II., ALESHCHENKO AV., GOTLIB VI. (2000). Increased radiosensitivity after irradiation of lymphocytes low adaptive doses. *Radiats Biol Radioecol* 40,544-548.
154. PERRY P. y WOLFF S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251, 156-158.
155. PINCU M., BASS D. y NORMAN A. (1984). An improved micronucleus assay in lymphocytes. *Mutation Research*, 139, 61-65.
156. PINTO DE., CEBALLOS JM., GARCIA G., GUZMÁN P., DEL RAZO LM., VERA E., GOMEZ H., GARCIA A., GONSEBATT ME. (2000). Increased cytogenetic damage in outdoor painters. *Mutation Research* 467, 105-111.
157. PLAPPERT U., RADDATZ K., ROTH S., FLIEDNER T.M. (1995). DNA-damage detection in man after radiation exposure –the comet assay- its possible appication for human biomonitoring. *Stem cells*, 13, Suppl. 1., 215-222.
158. PRABHAVATHI P., ARUNA F., SHEHLA K., PADRAVATHI P., KUMARI C., KUSUMA C., REDDY P.P. (1995). Sister chromatid exchanges in nuclear fuel workers. *Mutat. Res. Letts.*, 347, 31-35.
159. PROSSER J.S., MOQUET J.E., LLOYD D.C. y EDWARDS A.A. (1988). Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Research*, 199, 37-45.
160. PROSSER J.S., IZARD B.E., BROWN J.K., HETHERINGTON E.L., LAMBRECHT R.M., CATO L., WALLACE M., WHITWELL J., WISEMAN J. y HOSCHL R. (1993). Induction of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of

patients treated for rheumatoid or osteo-arthritis of the knee with dysprosium-165 hydroxide macroagregates or yttrium 90 silicate. *Cytobius*, 73, 7-15.

161. RAMALHO A., SUNJEVARIC I. y NATARAJAN A.T. (1988). Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-rays induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of two methods. *Mutation Research*, 207, 141-146.
162. RAYMOND JP, IZEMBART NI. MARLIAC: V, ET AL.(1989). Temporary ovarian failure in thyroid cancer patients after thyroid remnant ablation with radioactive iodine. *J Clin Endocrinol Metab* 69:186-190.
163. RON E, MORIN DOODY M. BECKER DV, ET AL.(1998). Cancer mortality followina treatment for adult hyperthyroidism. *JAMA* 280:347-355.
164. SAMET JM.(1997). Epidemiologic studies of ionizing radiation and cancer: past successes and future challenges. *Environ Health Perspect* 105 [Suppl 41: 883-889.
165. SARMA.L y KESAVAN P.C. (1993). Protective effects of vitamins C and E against y-ray-induced chromosomal damage in mouse. *International Journal Radiology Biology*, 63, 759-764.
166. SASAKI M.S. y NORMAN S. (1966). Proliferation of human lymphocytes in culture. *Nature*, 210, 913-914.
167. SCARFI M.R., BERNASI F., COSSARIZZA A., MONTI D., CASTELLANI G., CADOSSO R., FRANCESCHETTI G. y FRANCESCHI C. (1991). Spontaneous and mitomycin C induced micronuclei in human lymphocytes exposed to extremely low frequency pulsed magnetic fields. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 176, 194-200.
168. SCHMID W., ARAKAKI D.T., BRESLAU N.A. y CULBERTSON J.C. (1971). Chemical mutagenesis. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo system. I. Cytogenetic results on basic aspects of methodology obtained with alkylating agents. *Humangenetik*, 11, 103-118.

169. SCHMID W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, 31, 9-15.
170. SCHMID W. (1976). The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: *Chemical Mutagens IV* (Ed. Hollaender A.), Plenum Press, New York, p. 31-53.
171. SCHMID E., BAUCHINGER M. (1976). The cytogenetic effect of an X-rays contrast medium in Chinese hamster cell cultures. *Mutation Research* 31, 9-15.
172. SCHROEDER T.M. (1970). Investigation of bone marrow smears. En: *Chemical Mutagenesis in Mammals and Man* (Eds. Vogel F. y Röhrborn G.), Springer Verlag, Heidelberg, p. 214-218.
173. SHIMOI K., SHUICHI M., BINGRONG S., MICHIOYO F. y NAOHIDI K.(1996). Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. *Mutation Research*, 350. 153-161.
174. SINGH K.,y DEVI P.(1995). Modification of radiation-induced chromosome damage and micronucleus induction in mouse bone marrow by Misonidazole and hyperthermia. *Acta oncológica*, 34, 913-918.
175. SINGH N.P., GRAHAM M.M., SINGH V., KHAN A. (1995). Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of gamma-rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 68, 563-569
176. SLAVUTSKY I. y KNUUTILA S. (1989). Micronucleus formation in different lymphocyte subpopulations in pleplomycin-treated and control cultures. *Mutation Research*, 219, 257-261.
177. STARR T.J. (1963). Fluorescence microscopy and autoradiography of colchicine induced micronucleated cells. *Nature*, 200, 608-610.
178. STICH H.F., STICH W. y PARIDA B.B. (1982). Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer; Betel quid chewers. *Cancer*, 17, 125.

- 179.** STICH H.F. y ROSIN M.P. (1983). Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *International Journal Cancer*, 31, 305.
- 180.** STRAUME T., LUCAS J.N., TUCKER J.D., BIGBEE W.L., LANGLOIS R.G. (1992). Biodosimetry for a radiation worker using multiple assays. *Health Phys.*, 62, 122-130.
- 181.** SUGIHARA T, SAWADA S, HAKURA A, HORI Y, UCHIDA K, SAGAMI F.(2000). A staining procedure for micronucleus test using new methylene blue and acridine orange: specimens that are supravivally stained with possible long-term storage. *Mutation Research*, 470,103-108.
- 182.** SURRALLES J., CARBONELL E., PUIG M., XAMENA N., CREUS A. y MARCOS R. (1990). Induction of mitotic micronuclei by the pyrethroid insecticide fenvalerate in cultured human lymphocytes. *Toxicology Letters*, 54, 151-155.
- 183.** SWAIN DE., MILL AJ. (2000). An 11 year follow-up of individual radiation responses as assessed by micronuclei induction in peripheral blood lymphocytes. *J. Radiol Prot* 20, 189-96.
- 184.** SWEENEY DC, JOHNSTON GS.(1995). Radioiodine therapy for thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 24: 803-839.
- 185.** SZEPESE T., FLIEDNER T.M. (1994). Evaluation of accidental acute irradiated persons with respect to therapeutic measures. *Izotoptechnika, Diagnosztika*, 37, Suppl, 5-15. SINGH S.P., ABRAHAM S. y KESAVAN P.C.(1995). In vivo radioprotection with garlic extract. *Mutation Research*, 345, 147-153.
- 186.** TANAKA K., TCHAIJUNUSOVA NJ., TAKATSUJI T., GUSEV BL., SAKERBAEV AK., HOSHI M., KAMADA N. (2000). High incidence of micronuclei in lymphocytes from residents of the area near the Semipalatinsk nuclear explosion test site. *J Radiat Res* 41, 45-54.

187. THIERENS H., VRAL A., MORTHIER R., AOUSALAH B., DE RIDDER L. (2000). Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagenesis* 15, 245-9.
188. THODAY J.M. (1951). The effect of ionizing radiation on the broad bean root. Chromosome breakage and the lethality of ionizing radiations to the root meristem. *British Journal of Radiology*, 24, 572-578.
189. TORRES DE LEMOS C., ERDTMANN B., (2000). Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. *Mutation Research* 467, 1-9.
190. TRKOVA M., KAPRAS J., BOBKOVA K.(2000). Increased micronuclei frequencies in couples with reproductive failure. *Reprod-Toxicol* 14, 331-335.
191. TUCKER JD, PRESTON RJ.(1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat Res* 365: 147-159.
192. TUSCHL H., STEGER F., KOVAC R. (1995). Occupational exposure and its effect on some immune parameters. *Health Phys.*, 68, 59-66.
193. VALADAUD-BARRIEU D. (1983). Un "test d'induction de micronoyan" sur *allium sativum*; differentiation de substances clastogenes et mitoclasiques. *Mutation Research*, 119, 55.
194. VON LEDEBUR M. y SCHMID W. (1973). The micronucleus test methodological aspects, *Mutation Research*, 19, 109-117.
195. WATANABE N., YOKOYAMA K., KINUYA S. (1998). Radiotoxicity after iodine-131 therapy for thyroid cancer using the micronucleus assay. *Journal Nuclear Medicine* 39, 436-444.
196. WIESNER G., HOERAUF K., SCHOROEGENDORFER K., SOBZYNSKI P., HARTH M., RUEDIGER HW. (2001). High-level, but not low-level,

occupational exposure to inhaled anesthetics is associated with genotoxicity in the micronucleus assay. *Anesth Analg* 92, 118-22.

- 197.** WUTTKE K., STREFFER C. y MUELLER W.U. (1993). Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes. *Mutation Research*, 286, 181-188.
- 198.** WUTTKE K, STREFFER C, VLÜLLER WU, REINERS C, BIKO J. DEMIDCHIK E.(1996). Micronuclei in lymphocytes for children from the vicinity of Chernobyl before and after ^{131}I therapy for thyroid cancer. *Int J Radiat Biol* 69: 259-268.
- 199.** YAGER J.W. (1990). The effect of background variables on human peripheral lymphocyte micronuclei. International Agency for Research on Cancer (IARC) Scientific Publications, 104, 147-150.
- 200.** YAGER J.W., EASTMOND D.A., ROBERTSON M.L., PARIDISIN W.M. y SMITH M.T. (1990). Characterization of micronuclei induced in human lymphocytes by benzene metabolites. *Cancer Research*, 50, 393-399.
- 201.** YAGER J.M., SORSA M. y SELVIN S. (1988). Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes as an index of occupational exposure to alkylating cytostatic drugs. IARC Scientific Publications, 89, 213-216.
- 202.** ZANZONICO PB. (1997). Radiation dose to patients and relatives incident to ^{131}I therapy. *Thyroid* 7: 199-204.
- 203.** YAMAMOTO K.I. y KIKUCHI Y. (1980). A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and spindle poisons. *Mutation Research*, 71, 127-131.
- 204.** ZOTTI-MARTELLI L., PECCATORI M., SCARPATO R., MIGLIORE L. (2000). Induction of micronuclei in human lymphocytes exposed in vitro to microwave radiation. *Mutation Research* 472, 51-8.

CAPITULO XI.-APÉNDICE

COMPARACION ENTRE EL NUMERO DE MICRONUCLEOS ENCONTRADOS EN EL TUBO INICIAL SIN IRRADIAR Y LA EDAD.

Variables names are edad, tubo Ini.

use = 1, 3

Regress dependent is 3.

VARIABLES TO BE USED

1 edad 3 X(3)

NUMBER OF CASES READ 23

CASES WITH USE SET TO NEGATIVE VALUE 5

REMAINING NUMBER OF CASES 18

STANDARD COEFF.

VARIABLE MEAN DEVIATION VARIATION MINIMUM MAXIMUM

1 edad 61.1667 12.5850 0.20575 41.00000 84.00000

3 X(3) 1.9244 0.3713 0.19294 1.41420 3.00000

CORRELATION MATRIX

edad X(3)

1 3

edad 1 1.0000

X(3) 3 0.5070 1.0000

DEPENDENT VARIABLE 3 X(3)

TOLERANCE 0.0100

MULTIPLE R = 0.5074

MULTIPLE R-SQUARE = 0.2574

ANALYSIS OF VARIANCE

SUM OF

SQUARES DF MEAN SQUARE F RATIO P(TAIL)

REGRESION 0.6033 1 0.6033 5.547 0.0316

RESIDUAL 1.7402 16 0.1088

STD. STD.REG

VARIABLE COEFFIC. ERROR COEFF. T P(TAIL) TOLERANC

_INTERCEPT 1.00876

edad 1 0.0150 0.0064 0.51 2.36 0.03 1.0000

COMPARACION ENTRE EL NUMERO DE MICRONUCLEOS ENCONTRADOS EN EL TUBO INICIAL SIN IRRADIAR Y EL HABITO TABAQUICO.

Variables names are edad, fuma, tubo Ini.

use = 2, 3

grouping is 2

Group codes (2) are 0,1.

names (2) are fum, nofum.

Desing dependent are 3.

VARIABLES TO BE USED

2 fuma 3 tubo Ini.

NUMBER OF CASES READ 23

CASES WITH USE SET TO NEGATIVE VALUE 5

REMAINING NUMBER OF CASES 18

NUMBER OF GROUPS FOUND 2

VARIABLE

NO. NAME CODE GROUP INDEX CATEGORY NAME

2 fuma 0.000 1 fum

1.000 2 nofum

NUMBER OF CASES PER GROUP

fum 11

Efecto genotóxico de la radiación ionizante en procedimientos médico

```

nofum      7
TOTAL     18
ESTIMATES OF MEANS
           fum    no fum    TOTAL
           1     2       3
tubo Ini. 3   2.0269  1.7632  1.9244
ANALYSIS OF VARIANCE
SOURCE OF
VARIATION D.F.  SUM OF SQ.  MEAN SQ.  F-VALUE  PROB.
EQUALITY
OF C.M.   1   0.2974   0.2974   2.3259  0.1468
ERROR    16   2.0461   0.1279
T-TEST MATRIX FOR GROUP MEANS
           fum    nofum
           1     2
fum  1     0.0000
nofum 2   -1.5251  0.0000
PROBABILITIES FOR THE T-VALUES ABOVE
           fum    nofum
           1     2
fum  1     1.0000
nofum 2    0.1468          1.0000
    
```

RELACION DOSIS-EFECTO PARA RAYOS X.

Variables names are Tmn, dosis.

Regress dependent is 1.

independent is 2.

degree is 2.

VARIABLES TO BE USED

1 Tmn 2 dosis

NUMBER OF CASES READ 11

CASES WITH USE SET TO NEGATIVE VALUE 1

REMAINING NUMBER OF CASES 10

VARIABLE STANDARD

NO. NAME MEAN DEVIATION MINIMUM MAXIMUM

2 dosis 31.9290 52.8114 0.0000 162.4000

1 Tmn 2.6081 0.6645 1.7321 3.6056

CORRELATION MATRIX FOR THE REGRESSION COEFFICIENT (BETA) ESTIMATES.

OTH DEG 1 ST DEG

1 2

OTH DEG 1 1.0000

1 ST DEG 2 -0.5374 1.0000

POLYNOMIAL COEFFICIENTS ORTHOGONAL POLYNOMIAL

POLYNOMIAL IN X

REGRESSION STANDARD T

REGRESSION STANDARD T

DEGREE COEFFICIENT ERROR VALUE

COEFFICIENT ERROR VALUE

0 8.24763124 0.44637 18.48

2.29725736E+0 0.16738E+0 13.72

1 1.54257584 0.44637 3.46

0.97363729E-2 0.28174E-2 3.46

RESIDUAL MEAN SQUARE = 0.19925 (D.F. = 8)

MULTIPLE R-SQUARE = 0.59885

Efecto genotóxico de la radiación ionizante en procedimientos médico

CORRELATION MATRIX FOR THE REGRESSION COEFFICIENT (BETA) ESTIMATES.

	OTH DEG	1ST DEG	2ND DEG
	1	2	3
OTH DEG 1	1.0000		
1ST DEG 2	-0.5682	1.0000	
2ND DEG 3	0.4549	-0.9621	1.0000

POLYNOMIAL COEFICIENTS ORTHOGONAL POLYNOMIAL
POLYNOMIAL IN X

REGRESSION	STANDARD	T	
DEGREE	COEFFICIENT	ERROR	VALUE
0	8.24763124	0.40499	20.37
2.16934606E+0	0.17053E+0	12.72	
1	1.54257584	0.40499	3.81
0.24601268E-1	0.93709E-2	2.63	
2	-0.66775276	0.40499	-1.65
-0.98229099E-4	0.59575E-4	-1.65	

RESIDUAL MEAN SQUARE = 0.16402 (D.F. = 7)
MULTIPLE R-SQUARE = 0.71106

CASE	CASE	REGRESSION	2ND DEG
NO.	LABEL	WEIGHT	X VALUE
VALUE	RESIDUAL	VALUE	Y VALUE
1	1.00000	0.00000	2.00000
2.16935	-0.16935	0.19155	
2	1.00000	0.38000	2.00000
2.17868	-0.17868	0.18312	
3	1.00000	0.58000	2.23610
2.18358	0.05252	0.17869	
4	1.00000	1.51000	1.73210
2.20627	-0.47417	0.15828	
5	1.00000	4.28000	2.23610
2.27284	-0.03674	0.09897	
6	1.00000	9.45000	3.00000
2.39306	0.60694	-0.00568	
7	1.00000	17.32000	3.16230
2.56597	0.59633	-0.14988	
8	1.00000	40.45000	2.64500
3.00374	-0.35874	-0.46821	
9	1.00000	82.92000	3.46410
3.53389	-0.06979	-0.64289	
10	1.00000	162.39999	3.60560
3.57392	0.03168	0.45604	

DEGREE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE
F	TAIL PROBABILITY		
0	2.82543	2	1.41272
8.61	0.0130		
1	0.44589	1	0.44589
2.72	0.1432		
RESID	1.14811	7	0.16402

POLYNOMIAL / POWERS OF X

OTH POW	1ST POW	2ND POW
---------	---------	---------

Efecto genotóxico de la radiación ionizante en procedimientos médico

OTH DEG 0.316228E+0
 1ST DEG -0.201528E+0 0.631176E-2
 2ND DEG 0.101555E+0 -0.222611E-1 0.147104E-3

RELACION DOSIS-EFECTO RAYOS GAMMA.

Variables names are Tmn, dosis.

Regress dependent is 1.

independent is 2.

degree is 2.

VARIABLES TO BE USED

1 Tmn 2 dosis

NUMBER OF CASES READ 14

CASES WITH USE SET TO NEGATIVE VALUE 1

REMAINING NUMBER OF CASES 13

VARIABLE STANDARD

NO. NAME MEAN DEVIATION MINIMUM MAXIMUM

2 dosis 2700.7090 4763.2620 0.0000 16362.7998

1 Tmn 5.5683 4.1383 1.7321 16.3095

CORRELATION MATRIX FOR THE REGRESSION COEFFICIENT (BETA) ESTIMATES.

OTH DEG 1 ST DEG

1 2

OTH DEG 1 1.0000

1 ST DEG 2 -0.5082 1.0000

POLYNOMIAL COEFFICIENTS ORTHOGONAL POLYNOMIAL

POLYNOMIAL IN X

REGRESSION STANDARD T

REGRESSION STANDARD T

DEGREE COEFFICIENT ERROR VALUE

COEFFICIENT ERROR VALUE

0 20.07687432 0.93625 21.44

3.27765648E+0 0.30152E+0 10.87

1 13.99520001 0.93625 14.95

0.84817223E-3 0.56741E-4 14.95

RESIDUAL MEAN SQUARE = 0.87657 (D.F. = 11)

MULTIPLE R-SQUARE = 0.95308

CORRELATION MATRIX FOR THE REGRESSION COEFFICIENT (BETA) ESTIMATES.

OTH DEG 1ST DEG 2ND DEG

1 2 3

OTH DEG 1 1.0000

1ST DEG 2 -0.5657 1.0000

2ND DEG 3 0.4548 -0.9577 1.0000

POLYNOMIAL COEFFICIENTS ORTHOGONAL POLYNOMIAL

POLYNOMIAL IN X

REGRESSION STANDARD T

REGRESSION STANDARD T

DEGREE COEFFICIENT ERROR VALUE

COEFFICIENT ERROR VALUE

0 20.07687432 0.76539 26.23

2.95778548E+0 0.27676E+0 10.69

1 13.99520001 0.76539 18.28

0.12407190E-2 0.16127E-3 7.69

2 -1.94526120 0.76539 -2.54

-0.26216601E-7 0.10315E-7 -2.54

Efecto genotóxico de la radiación ionizante en procedimientos médico

RESIDUAL MEAN SQUARE = 0.58583 (D.F. = 10)
 MULTIPLE R-SQUARE = 0.97149
 CASE CASE REGRESSION 2ND DEG
 PREDICTED ORTH. POLY
 NO. LABEL WEIGHT X VALUE
 VALUE RESIDUAL VALUE Y VALUE

1	1.00000	0.00000	1.73210
2.95779	-1.22569	0.16444	
2	1.00000	13.93000	2.65400
2.97506	-0.32106	0.16163	
3	1.00000	18.05000	2.64500
2.98017	-0.33517	0.16080	
4	1.00000	72.62000	2.82340
3.04775	-0.22435	0.14985	
5	1.00000	104.29000	3.74170
3.08689	0.65481	0.14354	
6	1.00000	302.50000	4.00000
3.33070	0.66930	0.10463	
7	1.00000	623.95001	4.35890
3.72173	0.63717	0.04377	
8	1.00000	852.62000	4.47210
3.99659	0.47551	0.00218	
9	1.00000	1285.16003	4.79580
4.50901	0.28679	-0.07265	
10	1.00000	2628.06006	4.85570
6.03740	-1.18170	-0.27281	
11	1.00000	4543.83984	9.00000
8.05413	0.94587	-0.47424	
12	1.00000	8301.40039	11.00000
11.45082	-0.45082	-0.58200	
13	1.00000	16362.79980	16.30950
16.24016	0.06934	0.47087	
DEGREE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE
F	TAIL PROBABILITY		
0	199.64966	2	99.82483
170.40	0.0000		
1	3.78404	1	3.78404
6.46	0.0293		
RESID	5.85826	10	0.58583
POLYNOMIAL / POWERS OF X			
OTH POW	1ST POW	2ND POW	
OTH DEG	0.277350E+0		
1ST DEG	-0.163675E+0	0.606045E-4	
2ND DEG	0.164436E+0	-0.201796E-3	0.134772E-7

RELACION ENTRE EL NUMERO DE MICRONUCLEOS HALLADOS EN TUBO III Y LAS DOSIS DE RADIACION X RECIBIDAS.

Variables names are Tmn, dosis.

Tran X(1) = sqrt (X(1)).

Regress dependent is 1.

independent is 2.

degree is 2.

VARIABLES TO BE USED

Efecto genotóxico de la radiación ionizante en procedimientos médico

1 Tmn 2 dosis
 NUMBER OF CASES READ 16
 CASES WITH USE SET TO NEGATIVE VALUE 1
 REMAINING NUMBER OF CASES 15
 VARIABLE STANDARD
 NO. NAME MEAN DEVIATION MINIMUM MAXIMUM
 2 dosis 4.5097 4.3151 0.3800 17.3200
 1 Tmn 2.6548 0.7213 1.7321 4.5826
 CORRELATION MATRIX FOR THE REGRESSION COEFFICIENT (BETA) ESTIMATES.

 OTH DEG 1 ST DEG
 1 2
 OTH DEG 1 1.0000
 1ST DEG 2 -0.7342 1.0000
 POLYNOMIAL COEFFICIENTS ORTHOGONAL POLYNOMIAL
 POLYNOMIAL IN X

 REGRESSION STANDARD T
 REGRESSION STANDARD T
 DEGREE COEFFICIENT ERROR VALUE
 COEFFICIENT ERROR VALUE
 0 10.28186683 0.71606 14.36
 2.43533046E+0 0.27234E+0 8.94
 1 0.78581327 0.71606 1.10
 0.48669853E-1 0.44350E-1 1.10
 RESIDUAL MEAN SQUARE = 0.51275 (D.F. = 13)
 MULTIPLE R-SQUARE = 0.08478

CORRELATION MATRIX FOR THE REGRESSION COEFFICIENT (BETA) ESTIMATES.
 OTH DEG 1ST DEG 2ND DEG
 1 2 3

OTH DEG 1 1.0000
 1ST DEG 2 -0.8456 1.0000
 2ND DEG 3 0.7147 -0.9421 1.0000
 POLYNOMIAL COEFFICIENTS ORTHOGONAL POLYNOMIAL
 POLYNOMIAL IN X

 REGRESSION STANDARD T
 REGRESSION STANDARD T
 DEGREE COEFFICIENT ERROR VALUE
 COEFFICIENT ERROR VALUE
 0 10.28186683 0.74100 13.88
 2.32769555E+0 0.40292E+0 5.78
 1 0.78581327 0.74100 1.06
 0.96843566E-1 0.13681E+0 0.71
 2 -0.27696715 0.74100 -0.37
 -0.29056617E-2 0.77738E-2 -0.37
 RESIDUAL MEAN SQUARE = 0.54908 (D.F. = 12)
 MULTIPLE R-SQUARE = 0.09532

CASE CASE REGRESSION 2ND DEG
 PREDICTED ORTH. POLY
 NO. LABEL WEIGHT X VALUE
 VALUE RESIDUAL VALUE Y VALUE
 1 1.00000 0.58000 2.23607
 2.38289 -0.14682 0.29127
 2 1.00000 0.38000 2.00000
 2.36408 -0.36408 0.32404

Efecto genotóxico de la radiación ionizante en procedimientos médico

3	1.00000	17.32000	3.16228
3.13338	0.02890	0.52322	
4	1.00000	4.24000	2.00000
2.68608	-0.68608	-0.16025	
5	1.00000	6.25000	2.44949
2.81947	-0.36998	-0.28866	
6	1.00000	4.77000	2.00000
2.72353	-0.72353	-0.20234	
7	1.00000	4.28000	2.23607
2.68896	-0.45289	-0.16363	
8	1.00000	1.21000	2.44949
2.44062	0.00887	0.19352	
9	1.00000	9.45000	3.00000
2.98338	0.01662	-0.31817	
10	1.00000	0.53000	3.00000
2.37821	0.62179	0.29938	
11	1.00000	1.51000	1.73205
2.46730	-0.73525	0.14990	
12	1.00000	4.19000	3.31662
2.68246	0.63471	-0.15598	
13	1.00000	4.66000	2.82843
2.71589	0.11254	-0.19409	
14	1.00000	4.53000	2.82843
2.70677	0.12166	-0.18401	
15	1.00000	3.73000	4.58258
2.64850	1.93408	-0.11419	
DEGREE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE
F	TAIL PROBABILITY		
0	0.69421	2	0.34711
0.63	0.5483		
1	0.07671	1	0.07671
0.14	0.7151		
RESID	6.58900	12	0.54908
POLYNOMIAL / POWERS OF X			
	OTH POW	1ST POW	2ND POW
OTH DEG	0.2581989		
1ST DEG	-0.2792472	0.0619356	
2ND DEG	0.3886198	-0.1739329	0.0104910

RELACION ENTRE EL NUMERO DE MICRONUCLEOS HALLADOS EN TUBO IV Y LAS DOSIS DE RADIACION X RECIBIDAS.

Variables names are Tmn, dosis.

Tran X(1) = sqrt (X(1)).

Regress dependent is 1.

independent is 2.

degree is 2.

VARIABLES TO BE USED

1 Tmn 2 dosis

NUMBER OF CASES READ 15

VARIABLE STANDARD

NO. NAME MEAN DEVIATION MINIMUM MAXIMUM

2 dosis 4.5220 4.3212 0.3800 17.3200

1 Tmn 2.5023 0.7110 1.4142 3.8730

CORRELATION MATRIX FOR THE REGRESSION COEFFICIENT (BETA) ESTIMATES.

	OTH DEG	1 ST DEG		
	1	2		
OTH DEG 1	1.0000			
1ST DEG 2	-0.7348	1.0000		
POLYNOMIAL COEFFICIENTS ORTHOGONAL POLYNOMIAL				
POLYNOMIAL IN X				
	REGRESSION	STANDARD	T	
REGRESSION	STANDARD	T		
	DEGREE	COEFFICIENT	ERROR	VALUE
COEFFICIENT	ERROR	VALUE		
0	9.69136918	0.66525	14.57	
2.18047196E+0	0.25322E+0	8.61		
1	1.15070533	0.66525	1.73	
0.71169573E-1	0.41145E-1	1.73		
RESIDUAL MEAN SQUARE = 0.44256 (D.F. = 13)				
MULTIPLE R-SQUARE = 0.18709				

CORRELATION MATRIX FOR THE REGRESSION COEFFICIENT (BETA) ESTIMATES.

	OTH DEG	1ST DEG	2ND DEG		
	1	2	3		
OTH DEG 1	1.0000				
1ST DEG 2	-0.8447	1.0000			
2ND DEG 3	0.7129	-0.9418	1.0000		
POLYNOMIAL COEFFICIENTS ORTHOGONAL POLYNOMIAL					
POLYNOMIAL IN X					
	REGRESSION	STANDARD	T		
REGRESSION	STANDARD	T			
	DEGREE	COEFFICIENT	ERROR	VALUE	
COEFFICIENT	ERROR	VALUE			
0	9.69136918	0.67648	14.33		
2.37844696E+0	0.36720E+0	6.48			
1	1.15070533	0.67648	1.70		
-0.17460108E-1	0.12444E+0	-0.14			
2	0.51159476	0.67648	0.76		
0.53544637E-2	0.70802E-2	0.76			
RESIDUAL MEAN SQUARE = 0.45763 (D.F. = 12)					
MULTIPLE R-SQUARE = 0.22407					

CASE	CASE	REGRESSION	2ND DEG		
PREDICTED		ORTH. POLY			
NO.	LABEL	WEIGHT	X VALUE		
VALUE	RESIDUAL	VALUE	Y VALUE		
1	1.00000	0.58000	1.73205		
2.37012	-0.63807	0.29002			
2	1.00000	0.38000	2.23607		
2.37259	-0.13652	0.32266			
3	1.00000	17.32000	3.74166		
3.68228	0.05937	0.52611			
4	1.00000	4.24000	1.73205		
2.40068	-0.66863	-0.15941			
5	1.00000	6.45000	2.00000		
2.48859	-1.00278	-0.29501			
6	1.00000	4.77000	1.41421		
2.41699	-1.00278	-0.20125			

Efecto genotóxico de la radiación ionizante en procedimientos médico

7	1.00000	4.28000	2.23607
2.40180	-0.16573	-0.16277	
8	1.00000	1.21000	2.00000
2.36516	-0.36516	0.19268	
9	1.00000	9.45000	2.64575
2.69162	-0.04586	-0.31550	
10	1.00000	0.53000	2.64575
2.37070	0.27505	0.29810	
11	1.00000	1.51000	2.82843
2.36429	0.46414	0.14924	
12	1.00000	4.19000	3.00000
2.39929	0.60071	-0.15516	
13	1.00000	4.66000	2.44949
2.41336	0.03613	-0.19305	
14	1.00000	4.53000	3.00000
2.40923	0.59077	-0.18303	
15	1.00000	3.73000	3.87298
2.38782	1.48517	-0.11360	
DEGREE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE
F	TAIL PROBABILITY		
0	1.58585	2	0.79293
1.73	0.2182		
1	0.26173	1	0.26173
0.57	0.4641		
RESID	5.49151	12	0.45763
POLYNOMIAL / POWERS OF X			
OTH POW	1ST POW	2ND POW	
OTH DEG	0.2581989		
1ST DEG	-0.2796796	0.0618487	
2ND DEG	0.3869762	-0.1732420	0.0104662

RELACION ENTRE EL NUMERO DE MICRONUCLEOS DE LOS DIFERENTES TUBOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO EN RADIODIAGNOSTICO.

Variables names are tablas, TMN.

Tran X(2) = sqrt (X(2)).

Group codes (1) are 1 to 4.

Desing dependent are 1.

VARIABLES TO BE USED

1 tablas 2 TMN

NUMBER OF CASES READ 60

NUMBER OF GROUPS POUND 4

VARIABLE NO. NAME	STATED VALUES FOR MISSING	GROUP CODE	GROUP INDEX
1 Tablas	1.000	1	*1
	2.000	2	*2
	3.000	3	*3
	4.000	4	*4

NUMBER OF CASES PER GROUP

*1 15

*2 15

*3 15

*4 15

TOTAL 60

Efecto genotóxico de la radiación ionizante en procedimientos médico

ESTIMATES OF MEANS

	*1	*2	*3	*4	TOTAL	
	1	2	3	4	5	
TMN	2	1.9791	1.8268	2.6548	2.5023	2.2408

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

SOURCE OF

VARIATION	D.F.	SUM SQ.	MEAN SQ.	F-VALUE	PROB.
-----------	------	---------	----------	---------	-------

EQUALITY OF					
CELL MEANS	3	7.1940	2.3980	6.8701	0.005
ERROR	56	19.5466	0.3490		

T-TEST MATRIX FOR GROUP MEANS

	*1	*2	*3	*4	
	1	2	3	4	
*1	1	0.0000			
*2	2	-0.7061	0.0000		
*3	3	3.1318	3.8379	0.0000	
*4	4	2.4251	3.1311	-0.7067	0.0000

PROBABILITIES FOR THE T-VALUES ABOVE

	*1	*2	*3	*4	
	1	2	3	4	
*1	1	1.0000			
*2	2	0.4831	1.0000		
*3	3	0.0028	0.0003	1.0000	
*4	4	0.0186	0.0028	0.4827	1.0000

LECTURAS DOSIMETRICAS

LECTOR VINTEN TOLEDO TLD-100

SENSIBILIDAD LECTURA 24400; 14400; 04400

CICLO DE LECTURA STANDARD 16 sg + 16 sg

MUESTRA	CUENTAS 1	CUENTAS 2	C. NETAS	mGy
P-1	1190	1159	1009	0,58
P-2	817	846	666	0,38
P-3	27888	32695	30126	17,32
P-4	729	7782	7370	4,24
P-5	11967	10797	11216	6,45
P-6	8094	8819	8291	4,77
P-7	7544	7664	7438	4,28
P-8	2422	2103	2097	1,21
P-9	16222	16968	16429	9,45
P-10	1226	953	924	0,53
P-11	2696	2899	2632	1,51
P-12	8106	8436	7288	4,19
P-13	8854	9314	8101	4,66
P-14	8912	8815	7881	4,53
P-15	8017	6923	6487	3,73
C-1	23615	25266	24227	13,93
C-2	33830	29447	31425	18,07
C-3	135020	118000	126297	72,62
C-4	196260	166930	181382	104,29
C-5	531689	522447	526085	302,50
C-6	1137322	1034890	1085123	623,95
C-7	1612270	1355330	1482817	852,62
C-8	2233160	2231960	2231577	1283,16

Efecto genotóxico de la radiación ionizante en procedimientos médico

C-9	4411980	4731080	4570547	2628,06
C-10	8187730	7618900	7902332	4543,84
C-11	14123500	14752900	14437217	8301,40
C-12	27654032	26234000	26944016	16362,80
R-1	27844	42639	35028	20,14
R-2	85377	55759	70355	40,45
R-3	113773	175081	144214	82,92
R-4	231287	334016	282438	162,4

STANDARD DEVIATIONS FOR I-ST DEPENDENT VARIABLE

sexo	HOMBRE	MUJER		
pre	1	1.50000	1.20317	
post	2	2.94392	2.35736	
ANALYSIS OF VARIANCE FOR I-ST				
DEPENDENT VARIABLE - pre post				
SOURCE	SUM OF		D.F.	MEAN
TAIL	REGRESSION			F
	SQUARES			SQUARE
PROB.	COEFFICIENTS			
SEXO	8.53976		1	8,53876
I-ST COVAR	EDAD	7.79255		2,29
2.09		0.1624	0.0288	0.1445
ADJUSTED CELL MEANS FOR I-ST DEPENDENT VARIABLE				
SEXO	HOMBRE	MUJER		
pre	1	4.56904	3.98685	
post	2	10.31904	8.51066	

Screen Output will be written to file A:R23D1.9UT
BMDP3D - ONE-SAMPLE AND TWO-SAMPLE TESTS
PROGRAM INSTRUCTIONS

/problem title is 'Miquel:rayos beta'.
 /input variables are 5.
 format is free.
 file='a:r2.txt'.
 /variable names are caso,edad,sexo,pre,post,dif.
 add=1.
 use=6.
 /traft xW=1(5)-x(4).
 /end

REMAINING NUMBER OF CASES		25	
Dif	VAR.	6	VS. MEAN:0.0000
P-VALUE	DF		
MEAN		4.7200	1-SAMPLE T
		8.84	0.0005 24
H	STD DEV	2.6696	
H	S.E.M.		0.5339
SAMPLE SIZE	25		
R H	MAXIMUM		9.0000
MINIMUM	-1.0000		
1 A K, H		1 CASES A Z MAX	1.60
N- 25,1x	Z MIN	-2.14	
	CASE (MAX)		4
	CASE (Min)		12

Screen Output will be written to file A:R23D2.OUT
BOIP3D - ONE-SAMPLE AND TWO-SAMPLE T-TESTS
PROGRAM INSTRUCTIONS

Efecto genotóxico de la radiación ionizante en procedimientos médico

```

/problem title is 'Miquel:rayos beta'.
/input variables are 5.
format is free.
/variable names are caso,edad,sexo,pre,post,dif.
grouping is 3.
/group codes (3) are 1,2.
    Names (3) are hombre,mujer.
    MEMAINING NUMBER OF CASES . . . .25
CASE HUMBERS PRINTED BELOW REFER TO THE 25 CASES, ABOVE
3 sexo                1.000  1 HOMBRE
                    2.000  2 MUJER
GRGUP 1 hombre
                    2 mujer
                    hombre      mujer      TEST
STATISTICS P-VALUE DF
mean  5.7500
                    4.5238      LEVENE F FOR
                    VARIABILITY  0.44 0.5135 1,23
STD DEV  2.2174
S.E.N.  1.1087      0.6001      POOLED T 0.84 0.411423  4 21
SEPARATE T      0.97 0.3758 5.
Maximun      8.0000      9.0000
MINIMUM      3.0000      -1.0000
                    1.01      1.13
X z MIN      -1.24      -2.01
CASE (MAX)    4
CASE (MIN)    1      12
    
```

Screen Ouput **will** be written to file MULOUT
 BHDP3D - **ONE-SAMPLE AND TWO-SAMPLE T TESTS**
PROGRAM INSTRUCTIONS

```

/problem title is 'Miquel:Rayos qama'.
/input variables are 5. fomat is free.
/variable names are caso,edad,sexo,pre,post,dif.
add=1.
Use=6
    REMAINING NUMBER OF CASES . . . . . 26
dif  VAR. 6 YS. MEAN= 0.0000
                    TEST STATISTICS P-VALUE  DF
                    M E AN - 0.0759      1-sample T 00.27 0.7876 25
                    Stad desv1.4401
                    S.E.M.  0.2824
                    MAXIMUN      2.0000
                    MINIMUM -2.0000
                    Z MAX      1.44
                    Z MIN      -1.34
                    CASE (MAX)    3
                    CASE (MIN)    5
    
```

Screen Output will be written to file A:R13D2.OUT
 BMDP3D - ONE-SAMPLE AND TWO-SAMPLE.T-TESTS
PROGRAMÇ INSTRUCTIONS

```

/probleM title is 'Miguel:Rayos gaMa'.
/input variables are 5.
/variable names are caso,edad,sexo,pre,post,dif.
Grouping is 3
lgraup codes (3) are 1,2.
    names (3) are hombre,mujer.
/end
REMAINING NUMBER OF CASES . . . . . 26
    
```

GROUPS USED IN COMPUTATIONS- hombre mujer

```

dif      VARIABLE NUMBER 6
Grou p 1 hombre      2 mujer      hombre  mujer      TEST
STATISTICS P-VALUE
MEAN      0.0000      -0.1053  LEVENE F FOR
VARIABILITY      0.688 0.4190 1,
STD DEV      1.2910      1.5237
S.E.M.      0.4880      0.3496 POOLEED T      0.16
0.9726
x SAMPLE SIZE      7      19      SEPARATE T 0.18 0.8636 12.6
MAXIMUM 1.0000 2.0000
MINIMUM -2.0000 -2.0000
1 A N H 2 CASES A 1 AN X=2 CASES A Z MAX      0.77 1.38
      Z MIN -1.55      -1.24
      CASE (MAX)      2      3
      CASE (MIN) 22      5
    
```

ANALYSIS OF VARIANCE FOR 1-ST

```

DEPENDENT VARIABLE - prepost
SOURCE      SUM OF      D.F. MEAN      F      F
TAIL      REGRESSION      SQUARE      PROB.
      SQUARES
COEFFICIENTS
sexo      0.06421      1      0.06421      0.010.9098
1-ST COVAR      17.11486      1      17.11486      3.580.0713
0.0418
1 ERROR      110.07311      23      4.78579
R      0.02834      1      0.02834      0.030.8726
Rs      0.02834      1      0,02834      0.030.8726
2 ERROR      25.89474      24      1.07895
    
```

ADJUSTED CELL MEANS FOR 1-ST DEPENDENT VARIABLE

```

SEXO =      HOMBRE      MUJER
pr e      1      4.63638 4.60765
post      2      4.63638 4.50239
    
```

Screen Output Will be written to file A.R12V.OUT
 BMDP2V - ANALYSIS OF VARIANCE AND COVARIANCE WITH REPEATED MEASURES.

PROGRAM INSTRUCTIONS

```

/probleM title is 'Miquel:Rayos gaMa'.
/input variables are 5.
/variable names are caso,edad,sexo,pre,post,dif.
use=3,6.
/group codes (3) are 1,2.
      names (3) are hombre,mujer.
/design groupirq is 3.
      dependent are 4,5.
      cova=2,2.
      level is 2.
    
```

GROUP STRUCTURE

```

Sexo count
Hombre 7
Mujer 19
    
```

CELL MEANS FOR 1-ST COVARIATE

```

SEXO      HOMBRE      MUJER      MARGINAL
edad      1      58.85714      51.63158      53.57692
edad      2      58.35714 51.6315,8      53.57692
MARGINAL 58.85714 51.6315 53.57692
COUNT      7      19      26
    
```

Efecto genotóxico de la radiación ionizante en procedimientos médico

STANDARD DEVIATIONS FOR 1-ST COVARITATE

SEXO =		HOMBRE	MUJER
edad	1	18.07787	12.76806
	2	18.07787	12.76806

CELL MEANS FOR 1-ST DEPENDENT VARIABLE

		MARGINAL		
		hombre	mujer	
pre	1	4.85714	4.52632	4.61538
post	2	4.85714	4.42105	4.53846

MARGINAL		4.85714	4.47368	4.57692
COUNT		7	19	26

STANDARD DEVIATIONS FOR 1-ST DEPENDENT VARIABLE

Sexo		hombre	mujer
pre	1	1.57359	1.71167
post	2	2.11570	1.80480