

CAPÍTULO 8

Ensayos predictivos de radiosensibilidad

Eliana Ocolotobiche

Figura 8.1. Sueño y presentimiento. María Izquierdo.



Nota. <https://historia-arte.com/obras/sueno-y-presentimiento>

Introducción

La respuesta individual a la radiación ionizante (RI) ha sido identificada como un problema peculiar debido a la probabilidad de que las personas afectadas por una reacción anormal merezcan más atención y protección radiológica que los respondedores normales. Esta reacción comprende a la toxicidad tisular, referida como radiosensibilidad, y el cáncer radioinducido referido como radiosusceptibilidad. Mientras que la **radiosensibilidad** se relaciona a eventos tisulares adversos atribuibles a la muerte celular, después de altas dosis de radiación ionizante, la

radiosusceptibilidad alude a la carcinogénesis radioinducida o cualquier evento estocástico relacionado, como la transformación celular.

La principal fuente antropogénica de exposición a radiación para la población en general son las exposiciones médicas, tanto en términos de la cantidad de personas expuestas así como en relación a la dosis administrada. Las tres situaciones principales son: **radioterapia**, **radiodiagnóstico** y **radiología intervencionista**:

En oncología, más del 60 % de los pacientes se benefician de la **radioterapia**. Se observan excelentes tasas de éxito para tratamientos radicales con intención curativa, aunque varían considerablemente a largo plazo según el tipo de cáncer, incluso si el control local se logra a corto plazo. Desafortunadamente, en una fracción de los pacientes se presentan efectos adversos. Las tasas de toxicidad por radiación en tejidos normales, varían según el sitio de tratamiento, la modalidad de radioterapia y la dosis prescrita. La severidad de la lesión se clasifica según una o más escalas diferentes (p. Ej., CTCAE o RTOG). La radiotoxicidad en el tejido sano puede ocurrir semanas, meses o años después de la exposición, y es el factor limitante de la dosis al planificar el tratamiento radiante, particularmente cuando puede comprometer la calidad de vida del paciente. Otra clase de efecto adverso después de la radioterapia son los segundos cánceres inducidos por radiación. Representan aproximadamente el 8% de los segundos tumores en pacientes con radioterapia, y ocurren de una manera dependiente de la dosis, más comúnmente dentro o junto al campo de irradiación. Dado que se sabe que los pacientes con cáncer tienen un mayor riesgo de desarrollar segundos cánceres, espontáneos o radioinducidos, el tema de la sensibilidad a la radiación es complejo. Los individuos pueden exhibir una radiosensibilidad normal, pero aun así, tener un mayor riesgo de cáncer inducido por radiación, debido a un aumento general de sus factores de riesgo y una mayor probabilidad de progresión maligna. También puede darse el caso que algunas personas presenten el perfil de riesgo opuesto, con una mayor sensibilidad del tejido normal pero sin una mayor susceptibilidad al cáncer.

Para el **radiodiagnóstico**, la cuestión relevante es la posible aparición de cánceres inducidos por radiación, ya que es poco probable que la exposición a la radiación supere los umbrales de dosis de toxicidad tisular, incluso en personas sensibles. Sin embargo, varias modalidades de imágenes pueden administrar dosis considerables de radiación, agravadas por imágenes repetidas o seriadas, que pueden contribuir a una dosis acumulada significativa durante la vida de una persona.

La **radiografía intervencionista** plantea los mismos problemas que el radiodiagnóstico, pero con el potencial añadido de dosis más altas en áreas localizadas, donde tejidos como la piel, el corazón, los pulmones, el abdomen o el cerebro pueden recibir dosis superiores a 1 Gy. Como tal, ocasionalmente estos procedimientos presentan informes de eventos tisulares adversos.

Desde el punto de vista de la Radioterapia, la investigación de los mecanismos de lesión del tejido normal y los biomarcadores relacionados, son clave para facilitar la personalización del tratamiento. Además, con los avances en radiobiología, la radioterapia adaptativa se está volviendo cada vez más frecuente en la práctica clínica. Asimismo, en relación a la protección radiológica, el estudio de la sensibilidad individual a la radiación es relevante tanto para la toxicidad

tisular como para el (segundo) cáncer inducido por radiación. En consecuencia, estas dos situaciones deben estar claramente separadas para evitar malentendidos, no solo desde un punto de vista científico, sino también a efectos regulatorios y legislativos, donde los perfiles de riesgo y las responsabilidades legales pueden diferir considerablemente.

El principal objetivo de este Capítulo es revisar los potenciales ensayos de detección de radiosensibilidad individual y evaluar su estado de validación actual, así como las ideas para enfoques futuros. En cuanto a los ensayos de radiosusceptibilidad, la distinción entre sensibilidad a la radiación y sensibilidad al cáncer (espontánea o inducida por radiación) hace que sea difícil concebir una prueba única que pueda identificar a todos los individuos radiosusceptibles, dada la variedad de vías biológicas en las que las variantes o mutaciones genéticas pueden modular el riesgo de cáncer inducido por radiación.

Requisitos de las pruebas de detección

El objetivo de las pruebas de detección es predecir una respuesta intrínseca anormal y desconocida de un individuo a la RI. Es importante que el oncólogo radioterapeuta y el radiólogo intervencionista conozcan de antemano si un paciente es más radiosensible de lo normal para poder adaptar el tratamiento o el procedimiento intervencionista. En un contexto más amplio, las personas pueden beneficiarse al saber que tienen un mayor riesgo de cáncer inducido por radiación. Así, identificar a las personas con mayor radiosusceptibilidad posiblemente sea importante en entornos industriales para la protección de los trabajadores o en entornos legales para asignar responsabilidades, obligaciones o compensaciones.

La oportunidad de utilizar ensayos celulares de radiosensibilidad / radiosusceptibilidad para identificar individuos en riesgo extremo de cáncer inducido por radiación se define por las limitaciones técnicas, clínicas y de salud pública de tales esfuerzos. A nivel técnico, estos ensayos deben ser viables, económicos, oportunos, altamente específicos y sólidos. A nivel clínico, deben ser reconocidos internacionalmente, basados en evidencia y respaldados por los organismos correspondientes. Así, para la validación preclínica como biomarcador predictivo de radiotoxicidad, un ensayo debe ser replicado por diferentes grupos mediante estudios prospectivos, y para la validación, debe mostrar mejoras para el paciente en ensayos de intervención.

No obstante, aunque se ha estimado que hasta el 80% de las diferencias en la toxicidad pueden explicarse por la variación intrínseca del paciente, hay otros factores a tener en cuenta que influyen en la probabilidad de desarrollar efectos secundarios. Estos incluyen dosis de radiación, técnica, fraccionamiento, otros tratamientos concomitantes, edad, tabaquismo y comorbilidades. En este apartado, no se consideran estos factores, ya que pueden tenerse en cuenta sin un examen adicional y no son estrictamente intrínsecos a un individuo. Sin embargo, se debe considerar de qué manera la enfermedad o el estilo de vida pueden cambiar las reacciones potenciales a la RI, tanto en los ensayos de detección como en escenarios de exposición reales.

Ensayos para la detección de personas con mayor riesgo de reacciones tisulares adversas inducidas por radiación

Las reacciones adversas desarrolladas por exposición médica pueden variar desde problemas estéticos hasta un daño orgánico que cambia la vida. Las mismas se dividen en tempranas y tardías; mientras las primeras ocurren durante o en las semanas posteriores a la irradiación y son en su mayoría transitorias, las reacciones tardías ocurren meses o años después y normalmente son irreversibles.

El esquema de calificación más comúnmente utilizado es CTCAE (Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos), que califica a las reacciones en una escala de seis puntos: (0) ninguna; (1) leve; (2) moderada; (3) grave; (4) potencialmente mortal; y (5) muerte. Las reacciones de radioterapia de grado 4 y 5 son muy raras, y representan casos extremos de radiosensibilidad o errores en la dosimetría o en la administración de la dosis. Por lo tanto, la mayoría de los estudios tienen como objetivo predecir el grado 2 o 3. Las reacciones de grado 1 se consideran subjetivas, propensas a diferencias entre los calificadores y se excluyen, o no se consideran como reacción.

En cuanto a la radiosensibilidad, los ensayos deben poder establecer una correlación cuantitativa entre la dosis (en el rango de dosis relevante) y la escala clínica de complicaciones (grado 0 a 5). Una puntuación (o resultado) en el ensayo, debe definir la distribución de probabilidad (basada en datos clínicos) para un individuo, sobre los grados de toxicidad para un tratamiento de radioterapia estándar. Esta probabilidad de toxicidad es la que será útil tanto para los médicos como para los pacientes. Los ensayos pueden basarse en células vivas y sus respuestas a la irradiación, examinando características tales como cromosomas aberrantes, lesiones en el ADN y su reparación, o particularidades genéticas o genómicas en general.

Ensayos para la detección de individuos con mayor riesgo de cáncer inducido por radiación

Aunque la variación individual en el riesgo de cáncer inducido por radiación puede considerarse como una extensión de la radiosensibilidad individual, diferencias importantes debido a la naturaleza estocástica de la carcinogénesis por radiación justifican el uso del término distintivo, radiosusceptibilidad. Este término también describe mejor los mecanismos duales que podrían mediar un mayor riesgo de cáncer después de la exposición a radiación. Es decir, una mayor susceptibilidad a los eventos iniciadores de cáncer inducidos por radiación, o un aumento en la susceptibilidad a la progresión a malignidad a partir de una determinada célula iniciada. En el primer caso, la variación en la eficiencia y fidelidad del reconocimiento y la reparación del daño del ADN podría transmitir una mayor probabilidad de que las células alberguen una mutación iniciadora del cáncer que persista después de una determinada exposición a la radiación. En

este último, los rasgos genéticos preexistentes (por ejemplo, un sistema de vigilancia inmunológica menos eficaz o heterocigosidad para un gen supresor de tumores) pueden potenciar la progresión al cáncer en un individuo y no en otro. La radiosusceptibilidad teóricamente podría estar mediada por diferencias en los genes que regulan el control del ciclo celular, la apoptosis, la capacidad de respuesta del factor de crecimiento, además de la maquinaria canónica de reparación del ADN.

Figura 8.2



Nota. El problema multidimensional de la radiosensibilidad. La radiosensibilidad existe a través de múltiples escalas de personas y tiempo, dependiendo además de la organización tisular y de las características físicas de la irradiación. Este conjunto de variables dificulta la capacidad de predecir quién será sensible a los efectos tóxicos de la radioterapia.

Resumen de la situación actual

En la actualidad, no hay ningún ensayo de radiosensibilidad / radiosusceptibilidad de uso rutinario en la clínica y la mayoría aún tiene que avanzar a través de la etapa preclínica. Los ensayos específicos que han mostrado potencial predictivo de radiosensibilidad tisular temprana o tardía y que han progresado hasta la fase preclínica incluyen:

- Estudio de genes candidatos y de asociación de genoma completo
- Apoptosis de linfocitos inducida por radiación (ensayo RILA)
- Formación de focos inducidos por radiación (ensayo de focos)

Los ensayos adicionales que tienen datos preliminares o potencial teórico para predecir la radiosensibilidad tisular temprana o tardía, pero que aún no se han expandido a las pruebas preclínicas, o que han tenido resultados mixtos en las pruebas preclínicas, incluyen:

- Ensayos de daño y reparación del ADN inducidos por radiación (ensayo Cometa y micronúcleos, MN)
- Ensayos de supervivencia / muerte celular inducida por radiación (Ensayo clonogénico)
- Aberraciones cromosómicas inducidas por radiación
- Perfiles de expresión génica inducida por radiación
- Inmunofenotipificación
- Marcadores de senescencia
- Marcadores de imágenes (radiomics)

Estos ensayos se basan en gran medida en las vías canónicas de muerte celular y daño / reparación del ADN y casi todos utilizan células (o ADN) de la sangre. Asimismo, los potenciales ensayos de radiosusceptibilidad se superponen en gran medida con los de radiosensibilidad, con niveles similares de desarrollo y refinamiento, pero con menos evidencia que respalde su capacidad predictiva. Algunos ejemplos son: ensayo G2 (dado que la desregulación del ciclo celular es un paso importante de la propensión al cáncer, cualquier alteración en el punto de control de G2/M podría estar relacionado con la radiosusceptibilidad); ensayo de MN (este ensayo proporciona una medida de las rupturas cromosómicas residuales después de la exposición a RI, un exceso de MN también puede estar relacionado con la radiosusceptibilidad); ensayos de reparación incorrecta del ADN (se sugiere que, mientras que la radiosensibilidad es causada por roturas de ADN no reparadas, la propensión al cáncer está asociada con roturas de ADN mal reparadas).

Ensayo RILA

El ensayo de **Apoptosis de linfocitos inducida por radiación** (RILA del inglés: *Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis*), es un ensayo versátil, rápido y reproducible de radiosensibilidad específica del paciente. Consecuentemente es él que ha logrado el mayor progreso a través de la validación preclínica. Implica el cultivo de sangre completa de donantes, 24 horas antes de su irradiación con rayos X, seguida de otras 48 horas de cultivo. Al cuarto día, la muestra se prepara para citometría de flujo. Los linfocitos T citotóxicos se marcan con un anticuerpo CD8 y el ADN se marca con yoduro de propidio. Se utiliza citometría para cuantificar la proporción de células CD8+ que se encuentran en la última etapa de la apoptosis. Así, RILA se define como el porcentaje de muerte por apoptosis de linfocitos de sangre periférica inducida por una determinada dosis de radiación, menos la muerte celular espontánea. Se ha propuesto una relación inversa entre el porcentaje de apoptosis en linfocitos irradiados y la toxicidad tardía, es decir, la reducción en la apoptosis inducida por radiación de linfocitos es utilizada como predictor de una mayor probabilidad de toxicidad por radiación. Este hallazgo contrario a la intuición, donde se considera

que la apoptosis radioinducida esperada en linfocitos representa el caso 'normal', puede causar una confusión significativa y el mecanismo de esta asociación inversa aún no está claro.

Ensayo de focos

El ensayo de **formación de focos inducidos por radiación** (IRIF del inglés: *Irradiation induced foci*) es un método muy sensible para monitorear roturas de doble cadena del ADN y su reparación, utilizando dosis fisiológicamente relevantes. El ensayo consiste en la cuantificación de la formación de focos de γ H2AX (u otras proteínas asociadas a la maquinaria de reparación del ADN) en las DSB (del inglés: *double strand break*) y potencialmente la tasa de su pérdida después de la exposición a la radiación. Recientemente, se han desarrollado procedimientos para la cuantificación y el recuento automatizados, lo que permite que tenga una utilidad válida como biomarcador para evaluar la radiosensibilidad.

El ADN es el objetivo más importante de la exposición a la radiación para la supervivencia y la carcinogénesis. La respuesta al daño del ADN (DDR del inglés: DNA damage response), representa dos procesos: la transducción de señales y la reparación del ADN. Ambas vías interactúan, en tanto la reparación del ADN está regulada por la respuesta de señalización. Las proteínas quinasas humanas ATM (ataxia-telangiectasia, mutada) y ATR son centrales en la señalización iniciada por el daño del ADN. ATM es activado por ADN DSB (roturas de doble hebra), mientras que ATR responde a las regiones de ADN SSB (roturas de una sola hebra del ADN). Dado que las DSB son las lesiones biológicamente más relevantes inducidas por RI, y que activan la DDR, el proceso donde se han identificado los biomarcadores más útiles para detectar la sensibilidad a la radiación es en la señalización ATM.

Sintéticamente, los pasos en la respuesta de señalización ATM de relevancia para la detección y reparación de DSB, son los siguientes: cuando se censa un DSB en el ADN, se activa ATM y esta fosforila a H2AX, generando γ H2AX. Esto desencadena el ensamblaje de varias proteínas mediadoras de la respuesta al daño para formar focos inducidos por irradiación. El ensamblaje de estas proteínas culmina en el reclutamiento de 53BP1. Dado que H2AX solo se fosforila después de la activación de la DDR, γ H2AX proporciona una herramienta poderosa para monitorear la presencia de daño en el ADN. Se han generado anticuerpos γ H2AX muy específicos, permitiendo que los focos de γ H2AX en los DSB se puedan visualizar como focos discretos. Asimismo, 53BP1 representa un segundo marcador IRIF muy útil. En células no dañadas, 53BP1 es evidente como tinción de baja intensidad ya que la proteína se distribuye de manera difusa por todo el núcleo. Después de la exposición a la radiación, 53BP1 se concentra en IRIF, donde es visible como focos definidos.

El ensayo **ATM nucleoshuttling (ATM-NS)** utiliza inmunofluorescencia para monitorear la aparición de focos de ATM fosforilada (pATM) en núcleos de fibroblastos después de la irradiación. Se observa que la tinción para pATM disminuye en el citoplasma coincidente con la formación de focos nucleares, lo que los investigadores explican como el transporte de pATM desde

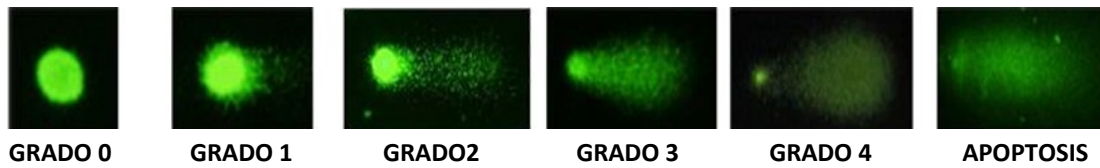
el citoplasma al núcleo. No obstante, la complejidad de este método obstaculizó su progresión en la práctica clínica. En consecuencia, el mismo grupo ha desarrollado un ensayo rápido que no requiere cultivo de fibroblastos, sino que fracciona el núcleo del citoplasma y luego cuantifica pATM por ELISA, pero el trabajo de desarrollo está en curso y el ensayo aún no ha sido probado por grupos independientes en cohortes de pacientes adicionales.

Ensayo Cometa

Durante aproximadamente los últimos 35 años, este ensayo se ha utilizado ampliamente para medir el daño y la reparación del ADN en células y tejidos. El ensayo cometa permite detectar las roturas de ADN presentes en cada célula. Debido a que se analizan las células individuales, las células muy dañadas o apoptóticas se pueden identificar y eliminar del análisis para determinar las tasas "verdaderas" de reparación de rupturas de cadenas de ADN. La importancia de medir el daño del ADN en células individuales radica en que hay muchos métodos capaces de medir roturas de ADN de una o dos hebras con buena sensibilidad, sin embargo, en células o tejidos heterogéneos, la respuesta promedio puede enmascarar la presencia de un pequeño número de células sensibles a la radiación. Otra ventaja importante de analizar células individuales es que se requieren relativamente pocas células. Esto hace posible realizar estudios clínicos utilizando células tumorales obtenidas de una única biopsia aspirada con aguja fina o células sanguíneas de un pinchazo en el dedo. El pequeño número de células requerido para este método, también hace que sea práctico combinar varias tecnologías de clasificación de células con el ensayo cometa.

El ensayo se basa en la electroforesis de células aisladas, embebidas en agarosa y colocadas sobre un portaobjetos de microscopio, que se lisan para formar nucleoides que contienen bucles superenrollados de ADN unidos a la matriz nuclear. Si el ADN está dañado, la electroforesis a pH alto da como resultado estructuras que se asemejan a los cometas, que son observadas por microscopía de fluorescencia después de teñir con un colorante de unión al ADN. La intensidad de la cola del cometa en relación con la cabeza refleja el número de roturas de ADN. La base probable de esto es que los bucles que contienen una rotura pierden su superenrollamiento y quedan libres para extenderse hacia el ánodo. La medición de cometas se puede realizar de dos maneras, mediante software de análisis de imágenes o mediante puntuación visual. Existen numerosos programas que permiten calcular los parámetros de fluorescencia de los cometas seleccionados por el operador. Los parámetros más utilizados son la longitud de la cola, la intensidad de fluorescencia relativa de la cabeza y la cola (normalmente expresada como un porcentaje de ADN en la cola) y el momento de la cola. La intensidad relativa de la cola es el parámetro más útil, ya que tiene una relación lineal con la frecuencia de rotura. Por otro lado, la puntuación visual es rápida y sencilla. El ojo humano se entrena fácilmente para discriminar grados de daño según la apariencia del cometa. Los cometas se pueden clasificar en 5 clases, desde 0 (sin cola) hasta 4 (casi todo el ADN en la cola), las células apoptóticas se registran por fuera de esta clasificación. En la figura se muestran las imágenes observadas al microscopio de fluorescencia.

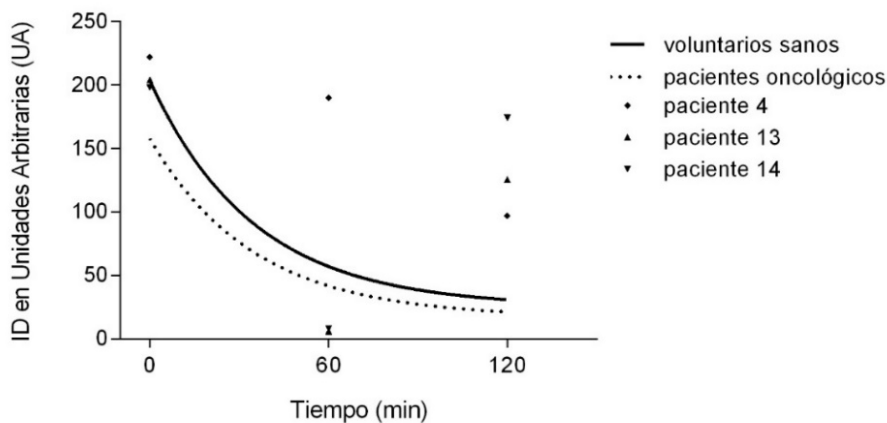
Figura 8.3. Clasificación de células según el grado de daño en el ADN por el ensayo Cometa.



Un particular enfoque en el uso del cometa, ha sido la propuesta realizada por nuestro grupo de investigación, de su uso para la instauración de un endofenotipo de radiosensibilidad individual. Las curvas de la cinética de reparación para voluntarios sanos y pacientes con cáncer esporádico podrían ser útiles en la identificación de potenciales individuos con mayor radiosensibilidad.

Figura 8.4

Cinética de reparación del ADN



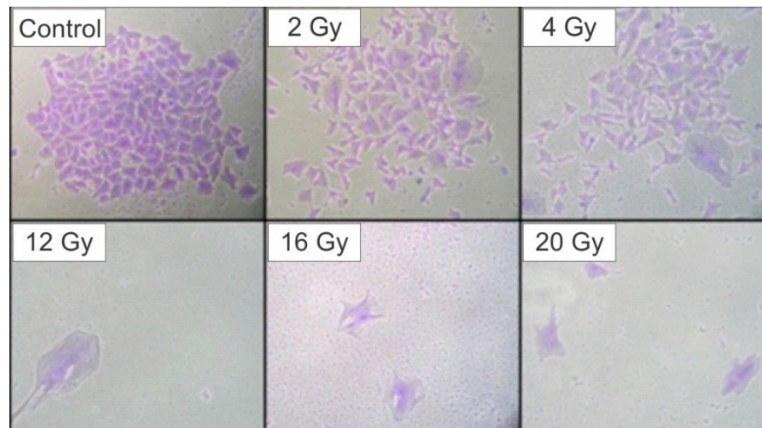
Nota. Cinética de reparación del ADN. En la figura se muestra el índice de daño en el ADN expresado en unidades arbitrarias en función del tiempo post irradiación de linfocitos de sangre periférica humana. Se analizaron muestras de voluntarios sanos, de un grupo de pacientes oncológicos que no presentan radiosensibilidad y de tres pacientes radiosensibles.

Ensayo clonogénico

El ensayo de sobrevivencia de células clonogénicas determina la capacidad celular de proliferar indefinidamente, conservando así su potencial reproductivo para formar una colonia. Por lo tanto, una célula que conserva su capacidad para sintetizar proteínas y ADN y pasar por una o dos mitosis, pero no puede dividirse y producir una gran cantidad de progenie, se considera “muerta”. Esto se conoce muy comúnmente como pérdida de la integridad reproductiva o muerte reproductiva. Por otro lado, una célula que no está muerta reproductivamente y que ha conservado la capacidad de dividirse y proliferar indefinidamente puede producir una colonia de células. Así, una curva de sobrevivencia celular se define como la relación entre la dosis del agente utilizado para producir una agresión y la fracción de células que retienen su capacidad para reproducirse.

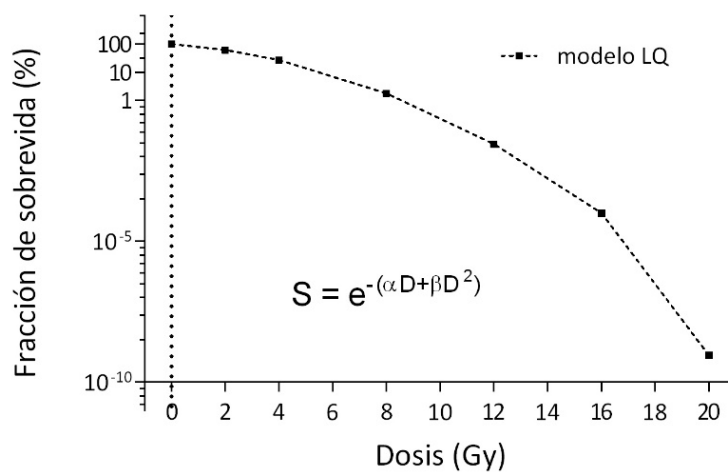
Metodológicamente, el ensayo consiste en preparar una suspensión de células de un cultivo en monocapa en crecimiento activo. Se cuenta el número de células por mililitro y se siembra un número conocido de células en una placa e incuba durante 10 a 14 días, permitiendo que cada célula individual se divida muchas veces y forme una colonia, visible a simple vista, especialmente si se fija y tiñe. Un grupo de células se considera una colonia si comprende aproximadamente 50 células. Todas las células que componen la colonia son la progenie de una sola célula. Si se sembraran por ejemplo 50 células, el número de colonias contadas puede oscilar entre 0 y 50. Lo ideal es que el número de colonias contadas fuera 50, pero rara vez es el caso por varias razones, incluido el medio de crecimiento subóptimo, errores en el conteo de células sembradas y la manipulación general. La siguiente figura corresponde a una visualización microscópica con aumento 100X de colonias obtenidas de un cultivo celular sometido a distintas dosis de irradiación.

Figura 8.5



Nota. Ensayo clonogénico en células A549 sometidas a irradiación con 2, 4, 12, 16 y 20 Gy y control sin irradiar (Gentileza Lic. Yuliana Banegas)

Figura 8.6



Nota. Representación del modelo Lineal Cuadrático (LQ del inglés: linear quadratic). Se grafica FS vs Dosis. Se utiliza en radioterapia para proyectar cual es la fracción de sobrevivida para cada tipo tumoral. En el caso de la radioterapia hipofraccionada, este valor se calcula principalmente para dosis de 2Gy.

El término eficacia de siembra en placa (EP) indica el porcentaje de células sembradas en una placa que finalmente crecen para formar una colonia.

$$EP = \frac{\text{Número de colonias contadas}}{\text{Número de células plaqueadas}} \times 100$$

Después de determinar la EP, se calcula la fracción de células que sobreviven (FS) a un tratamiento dado. La EP de la muestra control (el máximo valor posible, considerado el 100%) se utiliza para normalizar la eficacia de la siembra en placa de las muestras tratadas. La fracción superviviente se determina dividiendo la EP de las muestras tratadas por la EP de los controles y luego multiplicando por 100.

$$FS = \frac{EP \text{ de muestras tratadas}}{EP \text{ del control}} \times 100$$

Finalmente se grafica FS en función del tratamiento (Figura 8.6).

Análisis de aberraciones cromosómicas

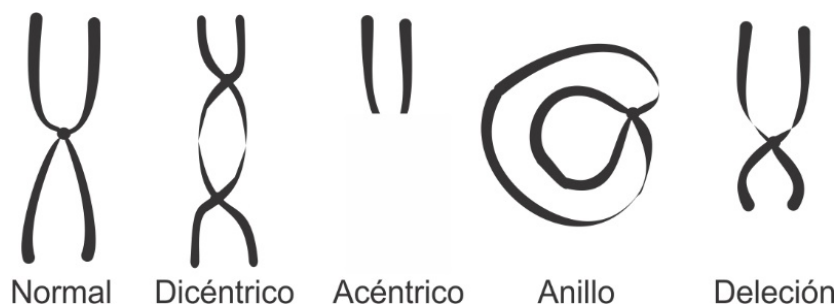
Tal como se mencionó previamente, la irradiación produce lesiones en los cromosomas, que pueden ser reparadas o no. Es así como se originan posteriormente las denominadas “aberraciones cromosómicas” (AC). Las AC son el indicador biológico de actividad genotóxica más ampliamente utilizado para evaluar la exposición a mutágenos y agentes carcinogénicos. Con la técnica de dosimetría citogenética se puede determinar el daño producido en las células de un organismo. El ensayo consiste en observar al microscopio aberraciones de los cromosomas de linfocitos T de sangre periférica humana. Estos cambios incluyen: anillos, cromosomas dicéntricos (con dos centrómeros), cromosomas acéntricos (sin centrómero), fracturas de cromosomas, y deleciones o poliploidía (cambio en el número de cromosomas).

Se ha documentado que las AC podrían gatillar una inestabilidad genómica y posteriormente el desarrollo de cáncer. Un biomarcador basado en el análisis de las aberraciones cromosómicas podría hacer posible la estimación del riesgo de contraer cáncer. Por lo tanto, las aberraciones cromosómicas en sangre periférica humana son un parámetro reconocido de daño celular y se emplean como indicadores de exposición a radiación ionizante y a ciertos químicos. No obstante, existen diversos factores que pueden jugar un papel importante en el procedimiento metodológico, provocando una discordancia en los resultados entre laboratorios. Estas diferencias se pueden deber a una discrepancia del análisis de las anomalías cromosómicas encontradas; a los cultivos en sí, a cambios en los procedimientos de irradiación, calibración de las dosis y condiciones y al tipo radiación utilizada, entre otras. Asimismo, la respuesta biológica a la radiación varía entre tejidos y organismos. Por esta razón se aconseja realizar curvas de calibración propias de muestras de sangre expuestas a dosis establecidas de radiación *in vitro*.

El ensayo se basa en tomar una muestra de sangre periférica del miembro superior ya sea de individuos no expuestos a radiación (para realizar una curva de calibración control) como de individuos expuestos a radiación. La muestra se divide en alícuotas, conservando las condiciones de asepsia necesarias para optimizar los cultivos. Cada alícuota se coloca en botellas de cultivo con medio óptimo y condiciones controladas. La estimulación en la división y proliferación de los linfocitos se logra mediante la adición de phytohemaglutinina. Posteriormente, se detiene la mitosis adicionando colchicina. Los cultivos se sacrifican, fijan y colorean, y se analizan 500 metafases por individuo para cada dosis de radiación. El análisis de las metafases se realiza mediante conteo de aberraciones cromosómicas en microscopio óptico.

Existen otros métodos que complementan el análisis citogenético, como el de micronúcleos (MN). La relación entre la aparición de aberraciones cromosómicas y de MN es muy estrecha, pero algunas veces se ha visto una frecuencia de MN más baja que la de los fragmentos acéntricos (FA), encontrándose curvas dosis-respuesta lineales positivas con tendencia a la saturación a altas dosis. Sin embargo, se emplea más frecuentemente los MN como examen de rutina dada su fácil lectura.

Figura 8.7. Esquema de los diferentes tipos de aberraciones cromosómicas.



Ensayo de micronúcleos

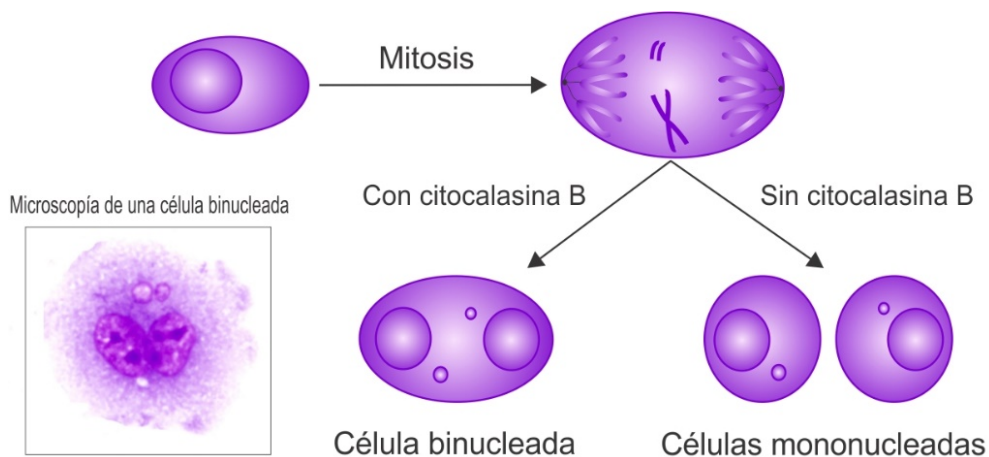
Los micronúcleos (MN) son pequeñas estructuras que contienen ADN, localizadas por separado del núcleo celular. Dependiendo de su formación, pueden contener cromosomas completos o fragmentos cromosómicos. Se generan en respuesta a diversos factores que dañan el genoma y su presencia en las células es un marcador de estrés genotóxico e inestabilidad genética. Además, en algunas enfermedades se encuentran células que contienen micronúcleos, p. Ej. en tumores, enfermedades autoinmunes y síndrome de envejecimiento prematuro.

La formación de MN puede ser causada por factores químicos y físicos. Dependiendo de los mecanismos, estos factores se dividen en clastogénicos y aneugénicos. Los aneugénicos producen alteraciones cromosómicas numéricas, por ejemplo aneuploidía y son consecuencia de la segregación anormal de los cromosomas y conducen a la formación de MN que contienen cromosomas intactos. Los clastogénicos provocan alteraciones en la estructura de los cromosomas,

se muestran como rupturas en el ADN, inhibición de la síntesis y de la replicación del ADN dañado y conducen a la formación de micronúcleos que incluyen fragmentos acéntricos de cromosomas. La mayoría de los factores físicos muestran un efecto clastogénico, entre ellos se encuentran la radiación, el ultrasonido y los cambios de presión y temperatura, entre otros.

Aunque todos los ensayos de MN se basan en el análisis de la frecuencia de los micronúcleos, varían en términos de células y protocolos utilizados. La versión más popular de MN es el ensayo de micronúcleos de bloqueo de citocinesis (CBMN). Los MN se cuentan en células binucleadas, donde la citocinesis (partición del citoplasma de una célula que da como resultado dos células hijas durante el proceso de división celular) se detiene mediante adición de *citocalasina B*. Dado que el MN es visible sólo después de la división celular, la *citocalasina B* que inhibe la polimerización de los filamentos de actina y la formación de microfilamentos contráctiles se utiliza para detener la citocinesis, sin embargo, no detiene la cariocinesis (división del núcleo de la célula), por lo que se forman células binucleadas con MN presente en su citoplasma. El CBMN se realiza predominantemente en linfocitos de sangre periférica humana para estudiar la formación *in vivo* de MN para biomonitoreo o dosimetría biológica. Asimismo, se utiliza con mucha frecuencia en muestras de sangre *in vitro* para estudiar los efectos genotóxicos de diversos factores.

Figura 8.8



Nota. Esquema de la formación de micronúcleos debido a la pérdida de un cromosoma entero y fragmentos cromosómicos de tipo acéntricos. Además se muestra una microscopía de células Chok1 binucleadas. Microscopía gentileza Dra. Noelia Nikoloff

Radiogenómica

La genómica de la radiación (radiogenómica), investiga la manera en que la variación genética puede ayudar a explicar las diferencias en la toxicidad temprana y tardía, de la exposición a radiación entre individuos, es decir, los cambios genómicos que subyacen a esta respuesta, tanto en tejidos normales como tumorales. Sin embargo, en ésta revisión no sólo nos centramos en el estudio genómico, sino también transcriptómico de la respuesta biológica a la

exposición a radiación. Cabe aclarar que la ómica es el estudio de la totalidad de "objetos" de una naturaleza determinada. Entonces, la genómica estudia el genoma y la transcriptómica estudia el transcriptoma.

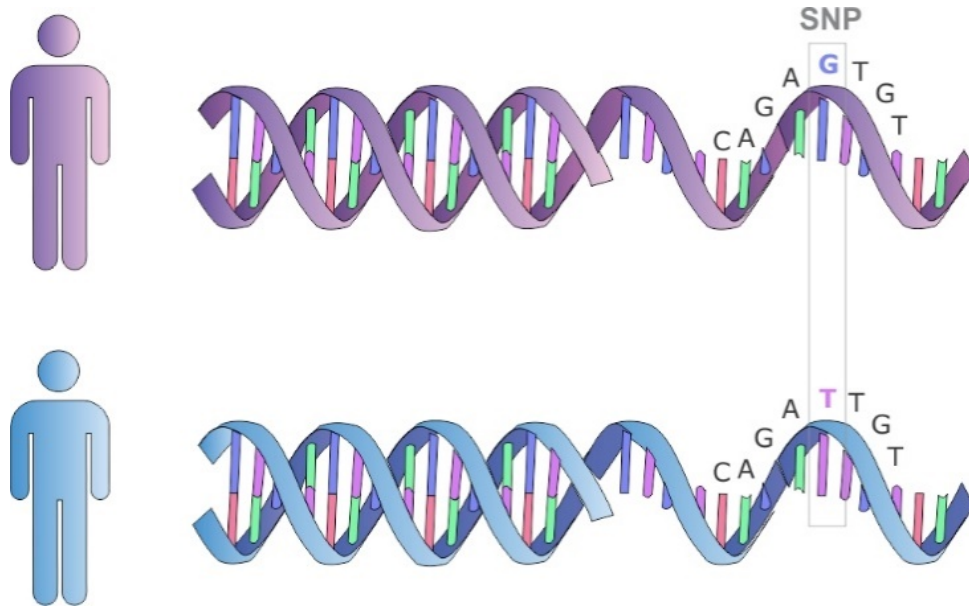
El campo de la radiogenómica ha progresado desde estudios de genes candidatos hasta estudios de asociación de genoma completo (GWAS del inglés: Genome-wide association study) y metanálisis. La genotipificación es cada vez más sofisticada y asequible, y la secuenciación del genoma completo pronto estará disponible como herramienta de diagnóstico en la clínica. El objetivo final de la investigación en radiogenómica es adaptar el tratamiento al individuo, con una prueba basada en una combinación de tratamiento, factores clínicos y genéticos. Esta personalización permitiría el mayor control tumoral y minimizaría la toxicidad aguda y a largo plazo. La integración de la radiogenómica en la oncología radioterápica tiene el potencial de personalizar una forma ya precisa de terapia contra el cáncer.

Análisis a nivel del genoma

Variaciones genéticas

La radiosensibilidad es un rasgo poligénico afectado por múltiples genes y vías biológicas. Hay principios clave de variación genética que sustentan el estudio de la radiogenómica. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son variaciones de la secuencia de ADN que ocurren cuando se altera un solo nucleótido dentro de un gen. Las variantes más frecuentes en el genoma humano consisten en SNP e inserciones o deleciones de unos pocos nucleótidos. Pero existen también otro tipo de variantes genéticas menos frecuentes, las variantes estructurales incluyen deleciones, inserciones, duplicaciones e inversiones. Por otro lado, las variaciones del número de copias (CNV) son grandes secciones del genoma en regiones específicas, que se repiten y el número de repeticiones varía entre individuos. Estas formas de variación genética ocurren tanto en áreas codificantes como no codificantes del genoma. Menos del 3% del genoma humano es ADN que se transcribe y se traduce en proteínas; el resto tiene una función reguladora importante y regiones de unión para potenciadores y silenciadores de la transcripción, reguladores de la metilación de genes, modificadores de la estructura de la cromatina y ARN no codificantes con función reguladora. Cualquiera de estos elementos puede desempeñar un papel en la determinación de la radiosensibilidad de una persona. El análisis de SNP es muy apropiado para su asociación con un punto final adverso del tejido normal, ya que solo requiere que el ADN para el análisis sea de una fuente de tejido normal y no de un tumor. Esto se debe a que los SNP son constitucionales; es decir, se encuentran en todas las células normales, incluidas las células sanguíneas.

Figura 8.9. Esquema de una variación genómica de tipo SNP.



Estudios de genes candidatos

Los primeros estudios de radiogenómica fueron pequeños y adoptaron el enfoque del gen candidato. Se sabe o se cree que los genes candidatos están implicados en el desarrollo de la toxicidad de la radioterapia, como los implicados en la reparación del daño en el ADN (p. Ej., ATM, BRCA1, BRCA2, TP53, XRCC1), la actividad antioxidante (p. Ej., SOD2, GSTP1), la fibrogénesis inducida por radiación (p. Ej., TNF, IL1, IL6, TP53, BCL2, TGFB) y el daño endotelial (p. Ej., VEGF). La hipótesis que subyace a los estudios de genes candidatos es que, dado que se sabe que las mutaciones homocigotas raras afectan la radiosensibilidad, los SNP comunes en estos genes tendrían efectos menores en nuestro fenotipo de interés. Por supuesto, el principal inconveniente de los estudios de genes candidatos es que requieren algún conocimiento a priori de la función del gen, lo que significa que se pasan por alto genes desconocidos implicados en el fenotipo. Los rasgos poligénicos involucran una combinación de variantes raras con efectos grandes, variantes moderadamente comunes con efectos moderados y cientos de variantes comunes con efectos pequeños. Cualquier enfoque en genes candidatos en radiogenómica, por lo tanto, pasa por alto la naturaleza poligénica de la radiosensibilidad.

Estudios de asociación de todo el genoma

El campo de la radiogenómica avanzó hacia los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) para permitir una investigación exploratoria libre de hipótesis. La ventaja de GWAS es que estudian todos los SNP, incluidos aquellos en regiones reguladoras y áreas del genoma cuya función aún no se comprende completamente. La suposición subyacente de GWAS es que los SNP en muchos genes contribuyen a la variación genética en la población, pero no hacen suposiciones sobre qué SNP o genes son importantes en el proceso biológico

relevante. Por lo tanto, los GWAS de rasgos y enfermedades buscan variantes genéticas comunes, cada una con pequeños efectos. Cada vez más, se reconoce la importancia de comprender la regulación de la expresión génica y el papel de los SNP y esto puede evaluarse en el análisis de locus de rasgos cuantitativos de expresión en GWAS. Estos análisis se centran en la evaluación del control regulador ejercido por determinados loci sobre la expresión de genes que influyen en un fenotipo.

Los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS), pueden requerir que decenas de miles de pacientes permitan identificar porcentajes modestos de loci genéticos asociados con un fenotipo determinado. Además, estos hallazgos son estrictamente asociaciones y no deben considerarse causales hasta que estén funcionalmente caracterizados. La accesibilidad de los materiales, los avances en las metodologías analíticas, la capacidad de realizar pruebas más grandes, las bibliotecas de SNP (12 millones en la base de datos SNP) y la acumulación continua de conjuntos de datos avanzará en el uso de GWAS, y la cantidad de pacientes requeridos podría disminuir.

Hasta el momento...

Tres polimorfismos genéticos encontrados por estudios de genes candidatos han replicado evidencia de asociación con reacciones adversas. Se ubican cerca o en los genes ATM, TNF α y XRCC1. Estos estudios se realizaron en pacientes con cáncer de mama y de próstata, y consistieron en varios miles de pacientes. Por otro lado, se han encontrado asociaciones adicionales mediante estudios de asociación de todo el genoma (GWAS), incluidos los genes TANC1, SATB2 y CCRN4L. Las asociaciones genéticas encontradas hasta la fecha, explican solo una pequeña proporción de la heredabilidad de los fenotipos de radiosensibilidad, y los datos sugieren que la contribución genética restante está compuesta por cientos de variantes que son comunes en la población, pero con un tamaño de efecto pequeño, aunque la presencia de variantes raras adicionales con efectos de gran tamaño no se pueden descartar.

Los estudios realizados destacan que los esfuerzos continuos en radiogenómica son valiosos y deben continuar. A nivel tumoral, es necesario aumentar los cánceres estudiados, para cubrir todos aquellos en los que la radioterapia tiene un papel en el tratamiento potencialmente curativo. La mayoría de los estudios publicados se han centrado en pacientes con tumores malignos de próstata o mama. A nivel genético, existe la posibilidad de evaluar otros tipos de variación genética, como inserciones, deleciones y CNV de nucleótidos, que pueden evaluarse en GWAS. El análisis genético se está volviendo más rápido, más rentable y más disponible. A nivel de aplicación, es necesario generar y validar puntuaciones de riesgo poligénico que formen parte de modelos clínicos.

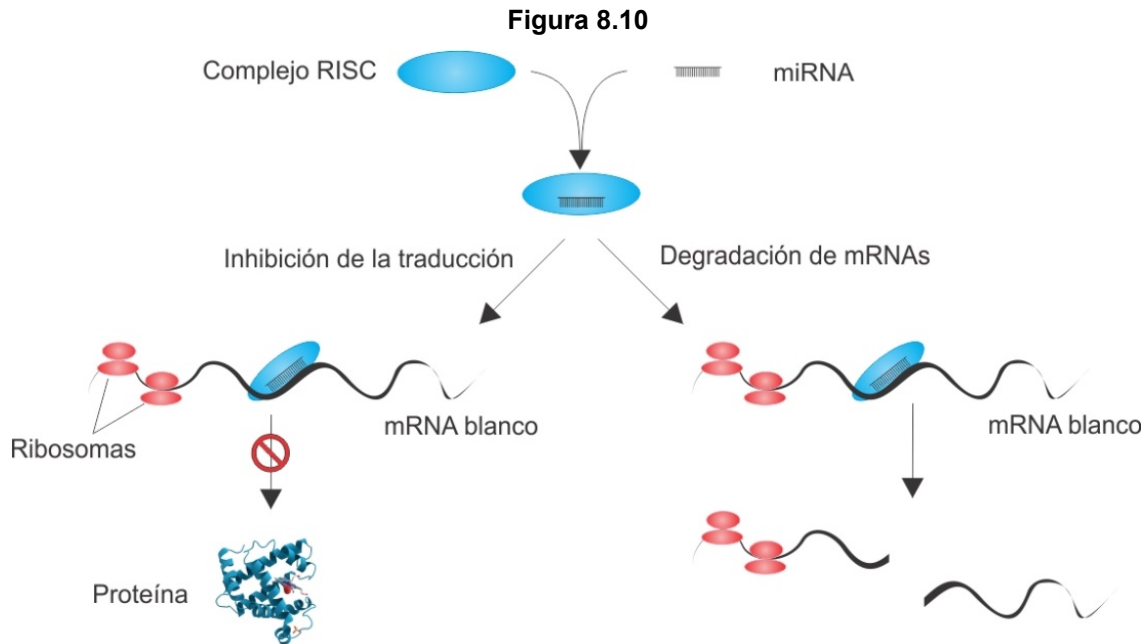
Análisis a nivel del transcriptoma

ARN codificante

La respuesta de las células tumorales y los tumores se ha estudiado predominantemente mediante análisis de transcriptomas. Los estudios iniciales identificaron a la reparación del ADN y la señalización del punto de control del ciclo celular, como vías clave alteradas en la respuesta a las exposiciones a la radiación de baja LET. Además se observó que los genes y las vías clave variaban según el tipo de célula (células leucémicas frente a tumores o tejidos sólidos). Asimismo, la respuesta de las células a las exposiciones a tasas de dosis bajas identificó genes inducibles a tasas de dosis bajas con implicaciones para la carcinogénesis y otros riesgos, no previstos a partir de experimentos con tasas de dosis altas. A partir de estos resultados, distintos grupos de investigación, realizaron estudios para identificar firmas de sensibilidad a la radiación usando la sobrevivencia celular como medida y diversos paneles de líneas celulares. Así, si bien se identificaron conjuntos de genes asociados con la radiosensibilidad, no hubo superposición en las firmas de genes.

ARN no codificante

Otro nivel de transcriptómica que se muestra prometedor en la comprensión de los procesos biológicos estudia los denominados ARN no codificantes (ncRNA). Estos ARN que no se traducen en proteínas abarcan alrededor del 70% del genoma, y provienen de regiones que antiguamente eran consideradas como ADN basura, pero contrariamente a esto, tienen una amplia gama de funciones biológicas. Los ncRNA de mayor interés para la respuesta a la radiación de células y tejidos de mamíferos son los microRNA (miRNA), que generalmente tienen una longitud de 18 a 22 nucleótidos. Los ncRNA largos (lncRNA), que tienen más de 200 nucleótidos de longitud, también son de interés, pero en menor grado, simplemente porque carecemos de conocimientos específicos sobre su papel en la radiorespuesta de las células de mamíferos. Se han identificado más de 2500 miRNA en humanos. Los miRNA son reguladores negativos de la expresión génica, que operan postranscripcionalmente para inhibir la traducción o potenciar la degradación de un mRNA específico. Esta función reguladora cubre una amplia gama de procesos celulares, tales como el desarrollo del organismo, la proliferación celular, las vías de muerte celular, la regulación del ciclo celular y la reparación del ADN. Los miARN pueden actuar como oncogenes silenciando genes supresores de tumor o regulando la división celular, y como supresores de tumor al suprimir oncogenes o activando vías de muerte celular. Muchos estudios han identificado la expresión alterada de miRNA después de la radiación ionizante y han estudiado cómo la alteración de la expresión de miRNA puede alterar la radiosensibilidad. Estos cambios a menudo ocurren a través de alteraciones en: la expresión de proteínas clave de la DDR; proteínas reguladoras del ciclo celular; regulación de especies reactivas de oxígeno celulares y proliferación de genes de apoptosis tales como p53, ATM, ATR, NFKB y BCL2.



Nota. Esquema de los probables mecanismos de acción de los miRNAs. Estos RNAs pequeños son cargados en el complejo RISC (del inglés: RNA-induced silencing complex) y lo guían hasta el mRNA blanco, que es reconocido por identidad de secuencia. Una vez identificado el mRNA, pueden actuar de dos formas: inhibiendo la traducción del mRNA a proteína, mediante el bloqueo del accionar de los ribosomas, o degradando el mRNA mediante su clivaje en una región de secuencia específica.

No obstante, el análisis de miRNAs tiene algunos desafíos: cada miRNA es capaz de regular múltiples genes, por lo tanto, se dificulta la identificación de los genes diana (mRNAs sobre los cuales el miRNA tiene efecto); La identificación de mRNAs diana a menudo no es confirmada por la biología sino más bien se basa en una probabilidad de interacción. No obstante, ciertos miRNAs se asocian con cánceres específicos y, lo que es más importante, con la baja radiorespuesta de cánceres específicos, como el glioblastoma, de mama, gástrico y cánceres de cabeza y cuello. En tal sentido, se ha desarrollado una firma de miRNAs para la radiosensibilidad en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). Además, los cambios en los miRNAs circulantes se han utilizado para el pronóstico del glioblastoma (después de la radioquimioterapia posoperatoria) carcinoma de células escamosas de esófago, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, y HNSCC. En resumen, estas asociaciones pueden servir como indicadores pronósticos de la respuesta terapéutica, ayudar a desarrollar indicadores de recurrencia de la enfermedad y servir para el desarrollo de diagnósticos a partir de sangre, orina o saliva.

Síndromes de radiosensibilidad individual

Como mencionamos previamente en este capítulo, si bien los eventos tisulares adversos inducidos por la radiación y los cánceres están relacionados, cada vez hay más pruebas de que la toxicidad y la carcinogénesis tienen bases moleculares diferentes. Por lo tanto, a continuación

se describen diferentes grados de manifestación de radiosensibilidad individual y se destacan aquellas patologías que además se asocian con una mayor radiosusceptibilidad.

Eventos tisulares fatales postradioterapia

La mayoría de los casos fatales posteriores a la radioterapia se observaron luego de la irradiación de cuerpo completo de niños con AT (ataxia telangiectasia), para el tratamiento de su leucemia o linfoma. La AT es una enfermedad genética rara, asociada con mutaciones homocigóticas en ATM, proteína esencial en la señalización para la reparación del daño de doble cadena en el ADN (DSB). La AT se considera el síndrome genético más radiosensible. Asimismo, existen otros casos de eventos fatales posteriores a la radioterapia, los cuales son causados por mutaciones homocigóticas de la ADN ligasa IV (LIG4), proteína esencial para la reparación del DSB por unión de extremos no homólogos (NHEJ). Ambas patologías están asociadas con un mayor riesgo de contraer cáncer (leucemias y linfomas).

Síndromes de radiosensibilidad con defectos de reparación de DSB

Se trata de síndromes genéticos que se caracterizan porque la mayoría de los genes mutados participan en la reparación de DSB, pero se asocian con una radiosensibilidad menos marcada que en los casos del punto anterior. Estos síndromes comparten una serie de características clínicas y biológicas comunes, como inestabilidad genómica, producción anormal de aberraciones cromosómicas, inmunodeficiencia y en general, propensión al cáncer. Son ejemplos de este grupo: Síndrome de Nijmegen (mutaciones homocigotas en NBS1 con propensión a leucemia y linfoma); trastorno similar a AT (mutaciones en MRE11); Anemia de Fanconi (mutaciones de genes FANC y mayor riesgo de leucemia, carcinoma de células escamosas y cáncer de mama); Síndrome de Bloom (mutaciones de BLM con propensión a leucemia y linfoma); Xeroderma pigmentoso (mutaciones de genes XP y mayor riesgo de cáncer de piel); Síndrome de Cockayne (mutaciones de CS con mayor riesgo de cáncer de piel para algunos tipos de mutaciones). Otra particularidad de estas sintomatologías es que las células con mutaciones de diferentes genes pueden mostrar una radiosensibilidad celular similar (por ejemplo, mutaciones de genes XP y CS) y por el contrario aquellas mutaciones en el mismo gen pueden mostrar diferente grado de radiosensibilidad (mutaciones en ATM).

Síndromes de radiosensibilidad “sin defectos directos de reparación de DSB”

Se trata de síndromes de radiosensibilidad que no están asociados directamente con defectos en la reparación de DSB, aunque se identifican por el mismo rango de características celulares y clínicas de los síndromes de la sección anterior. Estos síndromes están causados por mutaciones de genes cuyas proteínas se localizan en el citoplasma o la membrana nuclear, pero no necesariamente en el núcleo. Además, algunos de ellos se asocian con neurodegeneración progresiva, debido a su esperanza de vida reducida; en general los pacientes no presentan cáncer.

Son ejemplos: el Síndrome de Hutchinson-Gilford (mutaciones homocigotas de lámina A); Enfermedad de Bruton (mutaciones homocigotas de BTK); Síndrome de Gorlin (mutaciones de PTCH1 mayor propensión a cáncer de piel no melanoma).

Radiosensibilidad generalmente encontrada en radioterapia

Alrededor del 5 al 20 % de los pacientes con cáncer pueden experimentar algunas respuestas tisulares anormales (p. ej., inflamaciones, infecciones, ulceraciones, fibrosis, necrosis, dermatitis y rectitis) en diversas situaciones, durante poco o mucho tiempo después de finalizar la radioterapia, sin que ello implique errores en la entrega de la dosis.

Si bien existe una evidencia creciente de eventos tisulares adversos posteriores a la radioterapia en un número significativo de pacientes, estos eventos generalmente se observan según la experiencia local de cada oncólogo. Para cuantificar la gravedad de los eventos tisulares posteriores a la radioterapia, se propusieron algunas escalas de clasificación: las más utilizadas han sido los Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos (CTCAE) y los criterios de toxicidad del Grupo de Oncología Radioterápica (RTOG). Además, dado que una determinada gravedad de los eventos tisulares corresponde a un determinado exceso de dosis, el nivel de radiosensibilidad debe depender de la dosis. Por lo tanto, los ensayos moleculares y celulares que predicen la radiosensibilidad también deben reflejar ese exceso de dependencia de la dosis.

Por último, hay que destacar que estos eventos de radiosensibilidad informados por los oncólogos radioterápicos después o durante la radioterapia se encuentran en pacientes distintos de aquellos con síndromes de hiperradiosensibilidad o síndromes genéticos caracterizados en las secciones previas.

Conclusiones

Se podría concluir que la investigación significativa y el desarrollo de ensayos se han dirigido a los nodos clave en la carcinogénesis inducida por radiación y a la toxicidad tisular (daño y reparación del ADN, muerte celular), y si bien la mayoría de los ensayos muestran una promesa inicial para variantes raras y de alto impacto, muestran una sensibilidad y especificidad reducidas cuando se prueban en entornos clínicos. Es razonable esperar que, aunque los ensayos pueden sufrir de variabilidad experimental o requieran de un mayor desarrollo, existen otros factores que contribuyen a que estas fallas ocurran. Primero, **no se puede esperar que un solo ensayo prediga cada tipo de rasgo de sensibilidad o susceptibilidad**, ya que los mismos implican una amplia variedad de mecanismos. En segundo lugar, no todos los casos de toxicidad o cáncer inducido por radiación se deben a variaciones individuales en la sensibilidad o susceptibilidad. En tercer lugar, no todas las personas con mayor sensibilidad o susceptibilidad desarrollarán toxicidad tisular o cáncer inducido por radiación.

Por lo tanto, es razonable suponer que la implementación de múltiples ensayos celulares y biomarcadores, combinados con análisis genómicos e incluso modalidades adicionales como

enfoques radiómicos para datos de imágenes clínicas y métricas fisiológicas como el estado inmunológico, proporcionará mucha información actualmente nula. Todos los ensayos líderes actuales se beneficiarán de enfoques complementarios y una competencia saludable en los esfuerzos cooperativos internacionales para impulsar mejoras en todas las plataformas.

Referencias

- Figura 8.1. Bolaño E. (2021). <https://historia-arte.com/autores/emiliabolano>
- Andreassen CN, Schack LM, Laursen LV, Alsner J. (2016). Radiogenomics - current status, challenges and future directions. *Cancer Lett.* 382(1):127-136.
- Barnett G, Thompson D, Fachal L, Kerns S, Talbot C, Elliott RM, et al. (2014). A genome wide association study (GWAS) providing evidence of an association between common genetic variants and late radiotherapy toxicity. *Radiother Oncol.* 111(2):178-85.
- Bentzen SM. (2006). Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer.* 6:702-713.
- Britel M, Bourguignon M, Foray N. (2018). The use of the term 'radiosensitivity' through history of radiation: from clarity to confusion. *Int J Radiat Biol.* 94:1-31.
- Brothwell MRS, West CM, Dunning AM, Burnet NG, Barnett GC. (2019). Radiogenomics in the Era of Advanced Radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 31(5):319-325.
- Chaudhry MA. (2014). Radiation-induced microRNA: Discovery, functional analysis, and cancer radiotherapy. *J. Cell. Biochem.* 115: 436-449.
- Chen Y, Trotti A, Coleman NC, Machtay M, Mirimanoff RO, Hay J, O'Brien PC, El-Gueddari B, Salvajoli JV, Jeremic B. (2006). Adverse event reporting and developments in radiation biology after normal tissue injury: International Atomic Energy Agency consultation. *Int J Radiat Oncol Biology Phys.* 64:1442-1451.
- Ciccia A, Elledge SJ. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell.* 40:179-204.
- Collins AR. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 26(3):249-61.
- Constine LS, Ronckers CM, Hua C-H, Olch A, Kremer LCM, Jackson A, Bentzen SM. (2019). Pediatric Normal Tissue Effects in the Clinic (PENTEC): an international collaboration to analyse normal tissue radiation dose-volume response relationships for paediatric cancer patients. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 31:199-207.
- Cosset JM, Hetnal M, Chargari C. (2018). Second cancers after radiotherapy: update and recommendations. *Radioprotection.* 53:101-105.
- Cozzarini, C. (2015). Radiation induced lymphocyte apoptosis: an effective way of "tailoring" radiotherapy to the right patients only? *EBioMedicine.* 2(12), 1852-1853
- Crane C, Zamora HH, Bermúdez AJ, Barreto HG, Pardo CE, Ahumada JJ. (1994). Análisis de aberraciones cromosómicas para dosimetría citogenética. *Acta Médica Colombiana Vol. 19 N° 6.*

- Fhoghlú MN, Barrett S. (2019). A Review of Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Late Toxicity After Breast Radiotherapy. *J Med Imaging Radiat Sci.* 50(2):337-344.
- Foray N, Bourguignon M, Hamada N. (2016). Individual response to ionizing radiation. *Mutat Res.* 770:369-386.
- Gomolka M, Blyth B, Bourguignon M, Badie C, Schmitz A, Talbot C, Hoeschen C, Salomaa S. (2019). Potential screening assays for individual radiation sensitivity and susceptibility and their current validation state. *International Journal of Radiation Biology.*
- Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, et al., (2016). Influence of nucleoshuttling of the ATM protein in the healthy tissues response to radiation therapy: toward a molecular classification of human radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 94(3):450-460
- Habash M, Bohorquez LC, Kyriakou E, Kron T, Martin OA, Blyth BJ. (2017). Clinical and functional assays of radiosensitivity and radiation-induced second cancer. *Cancers.* 9:147.
- Ioannidis JP, Bossuyt PM. (2017). Waste, leaks, and failures in the biomarker pipeline. *Clin Chem.* 63:963-972.
- Kisurina-Evgenieva OP, Sutiagina OI, Onishchenko GE. (2016). Biogenesis of micronuclei. *Biochemistry Moscow.* 81, 453-464.
- Moller P. (2018). The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis.* 33(1):1-7.
- Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. (2005). Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med.* 110:21-8.
- Ocolotobiche EE, Dauder RM, Güerci AM. (2021). Radiosensitivity of radiotherapy patients: The effect of individual DNA repair capacity. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 867:503371.
- Olive PL. (2009). Impact of the comet assay in radiobiology. *Mutat Res.* 681(1):13-23.
- Ozsahin M, Crompton N, Gourgou S, Kramar A, Li L, Shi Y, Sozzi W, Zouhair A, Mirimanoff RO, Azria D. (2005). CD4 and CD8 T lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: a prospective study in 399 patients. *Clin Cancer Res.* 11:7426-7433.
- Pereira S, Bodgi L, Duclos M, Canet A, Ferlazzo ML, Devic C, Granzotto A, Deneuve S, Vogin G, Foray N. (2018). Fast and Binary Assay for Predicting Radiosensitivity Based on the Theory of ATM Nucleo-Shuttling: Development, Validation, and Performance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 100(2):353-360.
- Pointreau Y, Kreps S, Hennequin C. (2010). Evaluation des effets secondaires des radiations ionisantes. *Cancer Radiother.* 14:246-249.
- Prasanna PG, Stone HB, Wong RS, Capala J, Bernhard EJ, Vikram B, Coleman CN. (2012). Normal tissue protection for improving radiotherapy: Where are the Gaps? *Transl Cancer Res.* 1(1):35-48.
- Ramos-Avasola S, Rivera D, Segura K, Thraves E, Durán A, Soto V, Gamarra J, Ojeda MI. (2020). Análisis citogenético en linfocitos de trabajadores expuestos a radiación ionizante en una unidad de cardiología intervencional de Chile: Estudio piloto y revisión de la literatura. *Revista chilena de cardiología,* 39(1), 8-15.

- Roch-Lefevre, Mandina T, Voisin P, Gaetan G, Mesa JE, Valente M, Bonnesoeur P, Garcia O, Roy L. (2010). Quantification of gamma-H2AX foci in human lymphocytes: a method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure. *Radiat. Res.* 174:185-194.
- Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. (2020). Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 21(4):1534.
- Tan J, Lin X, Chua K, Lam P, Soo K, Chua M. (2017). Exploiting molecular genomics in precision radiation oncology: a marriage of biological and physical precision. *Chin Clin Oncol* 6(S2), S19.
- Tureson I, Nyman J, Holmberg E, Oden A. (1996). Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 36, 1065-1075.
- Warmerdam DO, Kanaar R. (2010). Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways. *Mutat. Res.* 704:2-11.
- Yard B, Chie E, Adams D, Peacock C, Abazeed M. (2015). Radiotherapy in the era of precision medicine. *Semin Radiat Oncol.* 25(4), 227-236.