

EL VALOR PREDICTIVO DEL ENSAYO COMETA EN LA EVALUACIÓN DE LA RADIOSENSIBILIDAD INDIVIDUAL EN SANGRE PERIFÉRICA

PREDICTIVE VALUE OF THE COMET ASSAY IN THE EVALUATION OF INDIVIDUAL RADIOSENSITIVITY IN PERIPHERAL BLOOD

**ALBA MABEL GÜERCI ANTOLA^{1,2,*}, LILIANA ANDREA ZÚÑIGA VENEGAS^{1,3}
Y RICARD MARCOS DAUDER¹**

¹ Grup de Mutagènesi. Departament de Genètica i de Microbiologia. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona. Campus Bellaterra 08193 Cerdanyola del Vallès. SPAIN.

² Laboratorio de Genética Toxicológica. Cátedra de Genética Microbiana. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata. La Plata. Argentina.

³ Laboratorio de Citogenética y Genética Toxicológica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

*Autor para correspondencia: albaguerci@yahoo.com.ar

RESUMEN

En numerosos trabajos la evaluación del daño genotóxico radioinducido se contempla desde la construcción de curvas de calibración con fines dosimétricos, aplicando técnicas citogenéticas. No obstante, el presente estudio propone, de manera innovadora, la utilización de estas curvas con el objetivo de evaluar la radiosensibilidad individual implementando el ensayo cometa.

Los resultados permiten sugerir que dentro del rango de 0 a 8 Gy la sensibilidad del método posibilita la predicción de la respuesta relativa individual (radiosensibilidad) en referencia al olive tail moment.

Considerando la falta de acuerdo en lo que respecta a la implementación de este ensayo y a los parámetros que representan de mejor manera el daño genético, se propone la realización de este tipo de estudios en diferentes laboratorios con el objetivo de lograr la unificación de criterios y metodologías de trabajo que conduzcan a opiniones consensuadas, necesarias para la correcta interpretación de los resultados.

PALABRAS CLAVES: Radiosensibilidad individual, ensayo del cometa, sangre periférica.

ABSTRACT

In many research works, the evaluation of radioinduced genotoxic damage is considered in the light of the construction of calibration curves with dosimetry aims, using cytogenetics techniques. However, the present research proposes, in an innovating way, the use of curves to evaluate the individual radiosensitivity when implementing the comet assay.

The results suggest that within the range 0 to 8 Gy the sensitivity of the used method allows the obtaining of a relative answer prediction (radiosensitivity) in relation to the olive tail moment.

Taking into account the lack of agreement about implementation of this assay and the parameters which better represent genetic damage, the accomplishment of this type of research in different laboratories is suggested. Our purpose is to reach agreement in work methodology and criteria which allow to produce an opinion on which consensus has to play an important key role, ensuring correct reading of results.

KEYWORDS: Individual radiosensitivity, comet assay, peripheral blood.

Recepción: 15/09/06. Revisión: 29/06/06. Aprobación: 23/11/06.

INTRODUCCIÓN

Dentro del marco genérico de las respuestas individuales, la radiosensibilidad es una característica personal asociada con una reacción aumentada a las radiaciones ionizantes (Di Giorgio *et al.*, 2003). En cuanto a esta respuesta es importante mencionar que existen notables diferencias entre los individuos. Así, ha sido observado que los efectos adversos que la caracterizan están influidos principalmente por la susceptibilidad genética a la radiación (Di Giorgio *et al.*, 2003; Di Giorgio *et al.*, 2001).

La importancia de su evaluación se visualiza no sólo desde la perspectiva de la seguridad radiológica, sino también desde la radioterapia. En referencia a ésta, la respuesta clínica en el volumen de tejido sano irradiado incluye efectos agudos, tardíos y cáncer. De esta manera se entiende que la significancia de estos estudios podría estar basada en la prevención de efectos deterministas y en la limitación de los efectos estocásticos a niveles aceptables. Aunque los límites de dosis efectiva suponen una respuesta homogénea de la población humana, existen subgrupos radiosensibles que muestran una mayor incidencia de los efectos mencionados (Di Giorgio *et al.*, 2003).

Desde otra perspectiva, los estudios *in vitro* de radiosensibilidad pueden llevarse a cabo mediante diferentes *end-points* biológicos tales como el ensayo clonogénico, frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE), pintado cromosómico, frecuencia micronúcleos (MN) y capacidad de reparación del daño residual entre otros (Di Giorgio *et al.*, 2003; Di Giorgio *et al.*, 2001; Di Giorgio *et al.* 1998; Nasazzi *et al.*, 2000).

En cuanto a los diseños implementados en la evaluación de este fenómeno, la construcción de curvas de calibración con indi-

viduos sanos y sin exposición genotóxica previa, es crucial a la hora de unificar protocolos y comparar resultados. En numerosos trabajos la importancia de estas curvas es mencionada para diferentes calidades de radiación y para evaluar los factores que afectan la sensibilidad del método, principalmente a dosis bajas y de baja transferencia lineal de energía (LET) (Di Giorgio *et al.*, 1998).

A pesar de la significancia de estas curvas, hasta el presente las mismas han sido hechas en su mayoría para estudios de dosimetría biológica, detectando lesiones citogenéticas por análisis de ACE y MN. Al respecto, la frecuencia de dicéntricos en linfocitos humanos es considerado como el método más sensible para cuantificar la exposición a radiación ionizante usando una curva de calibración *in vitro* apropiada, de acuerdo a la calidad de la radiación (Nasazzi *et al.*, 2000).

De acuerdo a lo expuesto, es evidente la necesidad de incrementar el cuerpo conceptual de las relaciones dosis-respuesta desde la perspectiva de otras técnicas y con otros fines. De esta manera, complementando la aproximación citogenética clásica para fines dosimétricos, consideramos oportuno proponer la evaluación del potencial predictivo del ensayo cometa (nivel citomolecular) para fines radioterapéuticos. Al respecto, Olive (1999) menciona que el desarrollo de este método permite examinar un número de cuestiones interesantes en radiobiología, dentro de las cuales la radiosensibilidad de poblaciones celulares tumorales merece destacarse. Sus ventajas prácticas lo convierten en una herramienta popular en oncología y genética toxicológica (Collins *et al.*, 1997; Fairbairn *et al.*, 1995). Por otra parte, este ensayo ha sido ampliamente utilizado en linfocitos de sangre periférica para la evaluación del daño inducido por radiaciones ionizantes y podría ser considerado como un

buen indicador de la radiosensibilidad individual. Así, la respuesta a una dosis recibida podría ser cuantificada desde una simple extracción sanguínea y su posterior análisis. Los linfocitos de sangre periférica son un tipo celular ideal para evaluar radiosensibilidad en tejidos normales, ya que la toma de la muestra es poco cruenta, son fáciles de utilizar en condiciones *in vitro* y proveen resultados rápidos (Di Giorgio *et al.*, 2001).

En cuanto a la implementación de la técnica, si bien los pasos generales de las distintas versiones están bien definidos, la mayoría de los grupos de trabajo han desarrollado variantes que impiden la comparación interlaboratorio de los resultados y como consecuencia la imposibilidad de estandarizar los parámetros que se utilizan preferencialmente para cuantificar el daño evaluado (Bocker *et al.*, 1997). Así, la interpretación de las dosis usando curvas de calibración realizadas en otro laboratorio, puede introducir incertezas extra-sustanciales y por esta razón se recomienda que cada laboratorio construya su propia curva dosis-respuesta (Lloyd y Edwards, 1983). Desde el punto de vista práctico, la alternativa experimental propuesta es la utilización de radiación ionizante (Olive, 1999).

El objetivo para la elaboración de una curva de calibración *in vitro* es determinar aquellos valores de los coeficientes matemáticos que mejor ajustan a los puntos de datos obtenidos en cada laboratorio (Lloyd y Edward, 1983).

En el presente trabajo se evaluó el daño inducido por rayos γ a través del ensayo cometa en linfocitos de sangre periférica, tratando de establecer los límites de detección y saturación de la técnica y contribuir al conocimiento de las relaciones dosis-respuesta para radiaciones de bajo LET.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos y muestras de sangre

El estudio estuvo comprendido por 10 donantes sanos (9 mujeres y 1 hombre), quienes no presentaban evidencias de desórdenes genéticos ni historial de exposición genotóxica previa. La edad media del grupo fue de 26,1 años. La toma de muestras se realizó en el Servicio Asistencial de Salud de la Universidad Autónoma de Barcelona. Al respecto, dos mL de sangre fueron colectados para cada individuo mediante punción endovenosa en vacutainer heparinizados y se transportaron al laboratorio. La sangre fue centrifugada y el sobrenadante removido. El pellet celular fue resuspendido en igual volumen de medio RPMI 1640 (Gibco) sin suplementos. Luego cada muestra fue dividida en 6 tubos eppendorf de 1.5 mL (250 μ L por tubo) correspondientes al control y a las 5 dosis evaluadas (1, 2, 4, 6 y 8 Gy).

Descripción de la irradiación

El procedimiento experimental de irradiación fue realizado por la Unidad Técnica de Protección Radiológica de la Universidad Autónoma de Barcelona (UTPR-UAB). La calibración de la unidad así como la determinación de la dosis se realizó por este servicio.

El equipo de irradiación corresponde a un irradiador específico para muestras biológicas y procedimientos experimentales. El IBL 437 tipo H, N°: 701 (SCHERING CIS bio internacional) contiene 189 TBq (5100 curies) de Cesio 137. Las muestras fueron ubicadas dentro del cilindro portador y localizadas dentro de la unidad. Sensores específicos chequearon el correcto posiciona-

miento de esta canasta. La secuencia temporal de irradiación comienza cuando la muestra alcanza la posición correcta y culmina cuando se alcanza la dosis requerida considerando la tasa correspondiente (tasa de dosis: 6,00 Gy/min).

Inmediatamente después del tratamiento radiante, las muestras se ubicaron sobre hielo, con el fin de minimizar la acción de los mecanismos de reparación (Collins, 2004).

Ensayo cometa

Este ensayo fue realizado en condiciones alcalinas, de acuerdo al método de Singh *et al.* (1988) con algunas modificaciones menores (Guillament *et al.*, 2004).

Se embebieron las células en agarosa de bajo punto de fusión (0,5%) y se depositaron en portaobjetos previamente cubiertos con 150 mL agarosa 0,5% de punto de fusión normal. Posteriormente los portaobjetos se sumergieron en solución de lisis pH 10 (2,5 M NaCl, 100mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, DMSO 10%, Triton X-100 1%) durante 24 hrs. A continuación se procedió a un tratamiento alcalino (300mM NaOH, 1mM Na₂EDTA,) por 20 min antes de la electroforesis. Esta última se realizó a 4°C, 25 V (0.73 V/cm) y 300 mA durante 30 min.

Análisis de imágenes

Las observaciones fueron hechas usando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX50, equipado con filtros de excitación de 515-560 nm) conectado a una cámara de video color CCD-IRIS Hitachi Denshi, Ltd. La imagen para cada célula fue capturada

empleando el programa Komet 5.5. Las células fueron analizadas considerando su Olive Tail Moment (OTM) y el % de ADN en la cola.

Análisis estadístico

Asumiendo diferencias altamente significativas a valores de $p < 0.001$ los datos fueron analizados mediante el test *t*-Student. Por otra parte, para la estadística descriptiva se utilizaron los software Stat Graphics 3.0 Plus® y Microsoft Office Excel 2003.

Ensayos de validación

En una segunda instancia, luego de la construcción de las curvas pertinentes a ambos parámetros analizados, se procedió a la validación de los resultados. Al respecto, se evaluaron nuevamente muestras de sangre de dos individuos del grupo estudiado (elegidos al azar). Las mismas fueron sometidas a dos dosis de radiación, desconocidas al momento del análisis y dentro del rango evaluado y analizadas a ciegas con el fin de observar con el mayor grado de objetividad el nivel de daño inducido.

Finalizado el estudio, se procedió a la decodificación de las dos dosis utilizadas reportando los registros de la UTPR, los valores de 2 y 6 Gy respectivamente.

RESULTADOS

Mediante la Tabla I se presenta la estadística descriptiva de los datos abordados de manera genérica y que permiten una mejor interpretación de las curvas de calibración poste-

riormente presentadas. Por otra parte, también se muestra la diferencia estadísticamente significativa entre las dosis arrojada por la prueba *t*-student.

En la Figura 1 se puede observar las curvas dosis-efecto en referencia al OTM, para cada individuo analizado. En la mayoría de los casos se observa tanto una buena aproximación lineal como polinómica. No obstante, sólo los resultados con el mejor ajuste se representan gráficamente (polinómico de segundo orden).

En las Figuras 2a y 2b se observan las curvas de calibración generales para el mismo parámetro analizado, pero con ambas aproximaciones matemáticas.

En la Figura 3 se visualizan las curvas do-

sis-efecto que demuestran el daño evaluado mediante el % de ADN el la cola. Como en el caso previo, también se observa una buena relación tanto lineal como polinómica. Sólo los resultados con el mejor ajuste se representan gráficamente. En este caso, las curvas de calibración con ambas aproximaciones se presentan mediante las Figuras 4a y 4b.

Por otro lado, los resultados de la validación de las curvas realizadas para OTM y % ADN en la cola son presentados por medio de la Tabla II y de las Figuras 5a y 5b y 6a y 6b, respectivamente. En referencia a esta prueba en las Figuras 7a y 7b demuestran gráficamente los Intervalo de confianza (IC) para la totalidad de las dosis analizadas ($\alpha=0,5$).

TABLA I. Estadística descriptiva de la población estudiada. Parámetros analizados por la versión alcalina del ensayo cometa en el rango de 0 a 8 Gy.

	Dosis (Gy)*						N	Edad (años)
	0	1	2	4	6	8		
Medias OTM±SD	1,74±1,55	2,58±2,12	3,71±2,51	8,22±5,24	11,31±4,97	15,44±5,94	10	26,1
Medias %ADN±SD	17,31±11,36	21,38±12,58	24,35±11,78	36,93±12,36	48,51±11,66	58,06±10,48	9	26,4

*: Diferencias altamente significativas entre dosis (*t*- student; $p<0.001$).

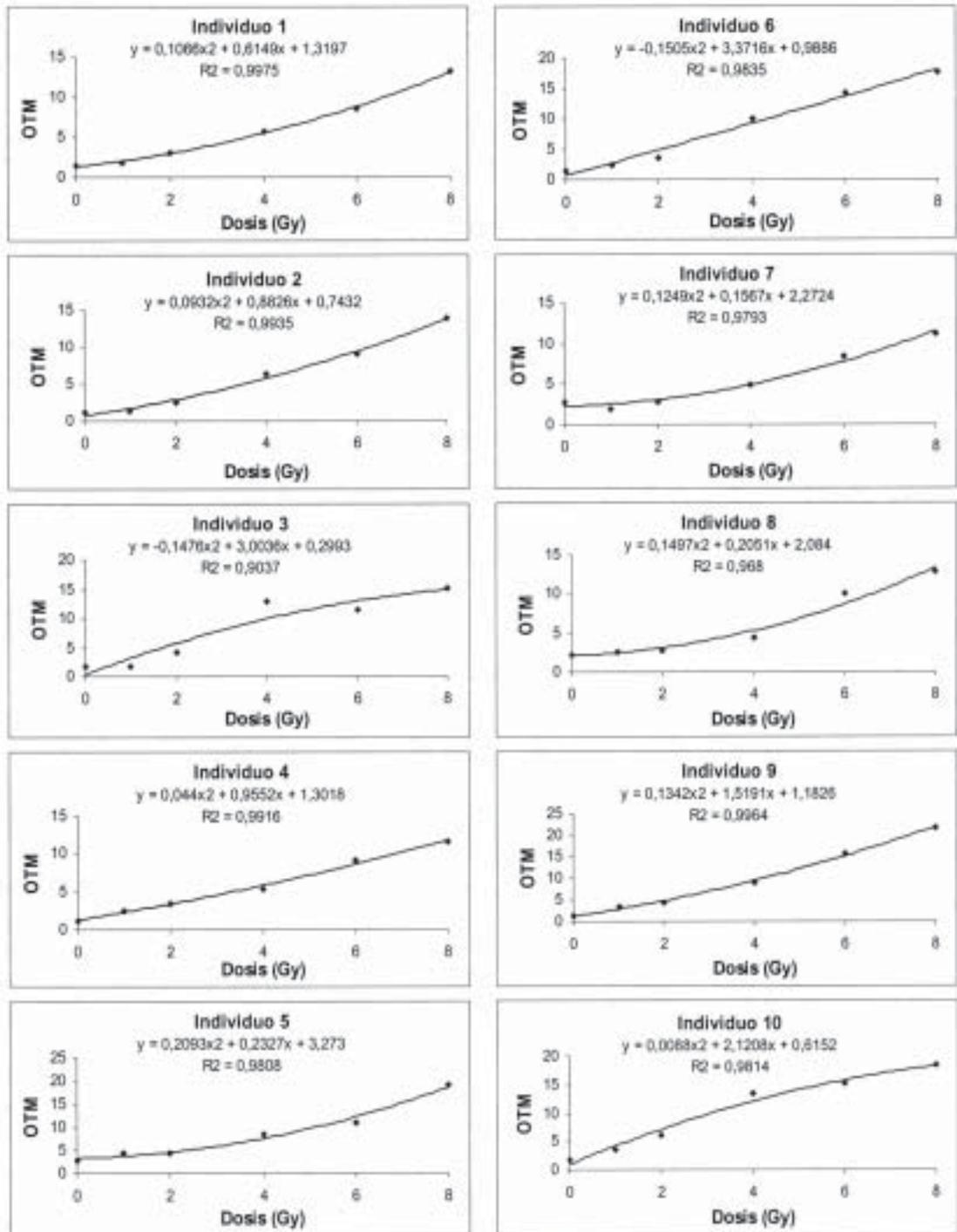


FIGURA 1. Curvas individuales dosis-respuesta mediante el ensayo del cometa. Daño en el AND (OTM) inducido por rayos γ en un rango de 0 a 8 Gy. Se muestra el coeficiente de correlación y el ajuste de la ecuación matemática en cada caso.

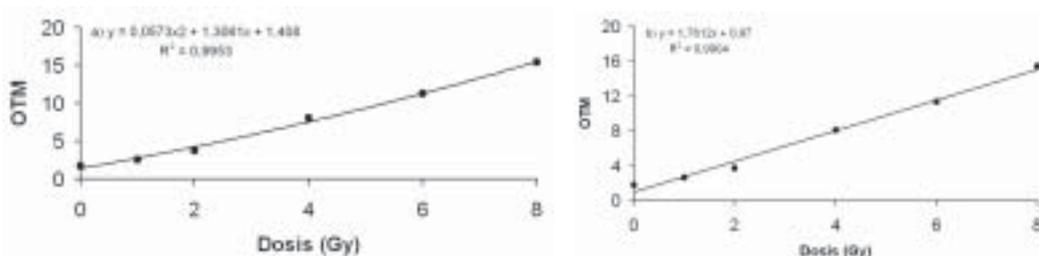


FIGURA 2. Curvas Calibración para el parámetro OTM. a) Aproximación polinómica; b) Aproximación lineal. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación matemática en cada caso.

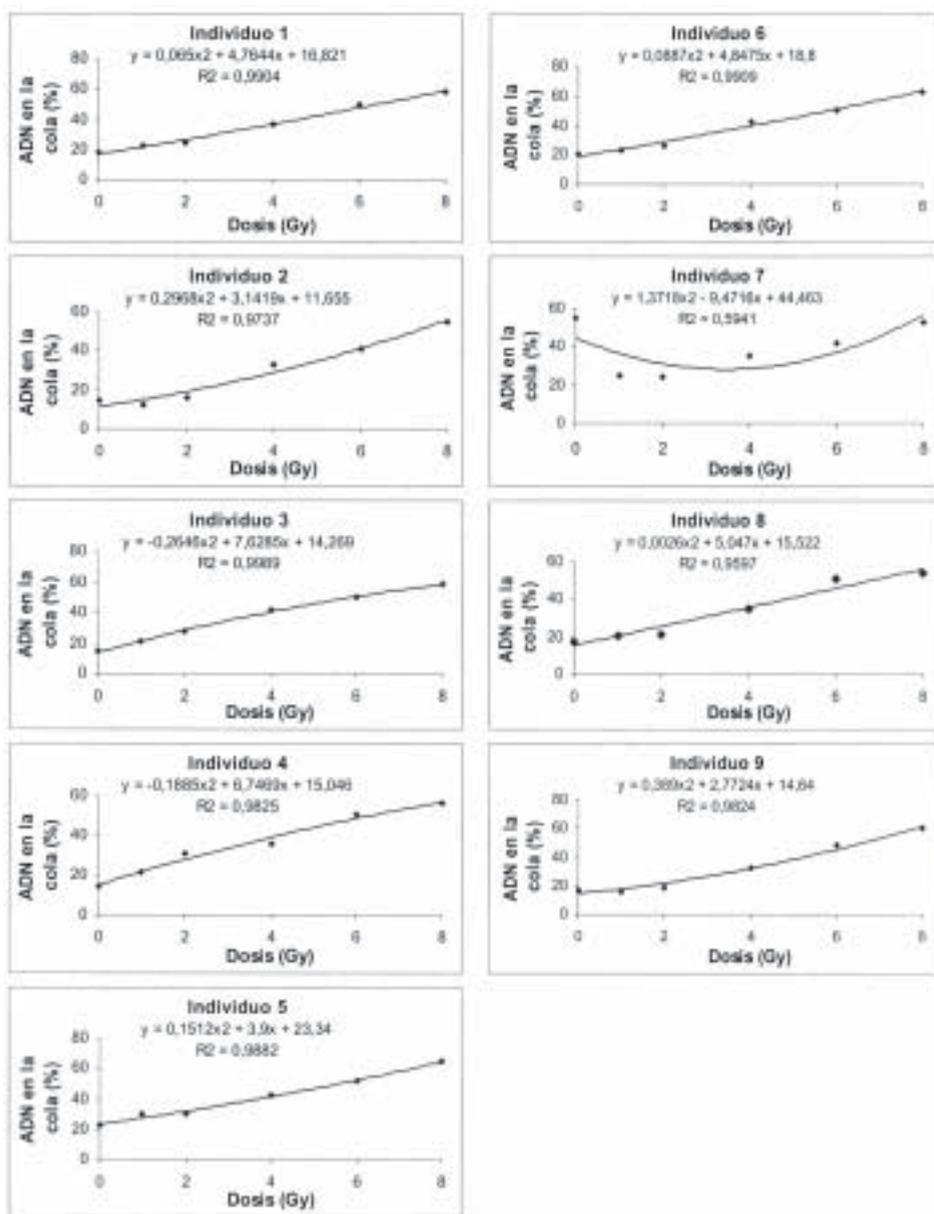


FIGURA 3. Curvas individuales dosis-respuesta mediante el ensayo del cometa. Daño en el AND (% ADN en la cola) inducido por rayos γ en un rango de 0 a 8 Gy. Se muestra el coeficiente de correlación y el ajuste de la ecuación matemática en cada caso.

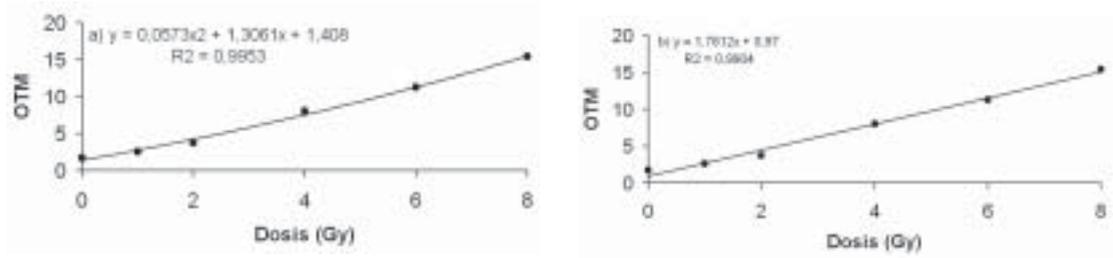


FIGURA 4. Curvas Calibración para el parámetro % ADN en la cola. (a) Aproximación polinómica (b) Aproximación lineal. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación matemática en cada caso.

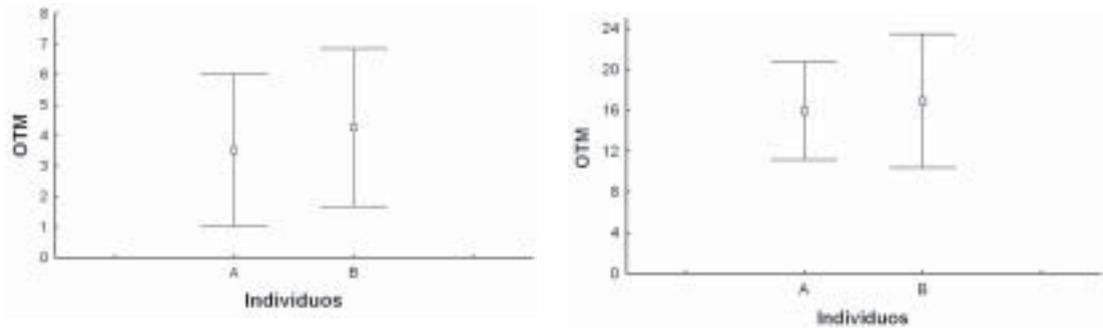


FIGURA 5. Ensayos de validación. Valores del daño radioinducido mediante el parámetro OTM.

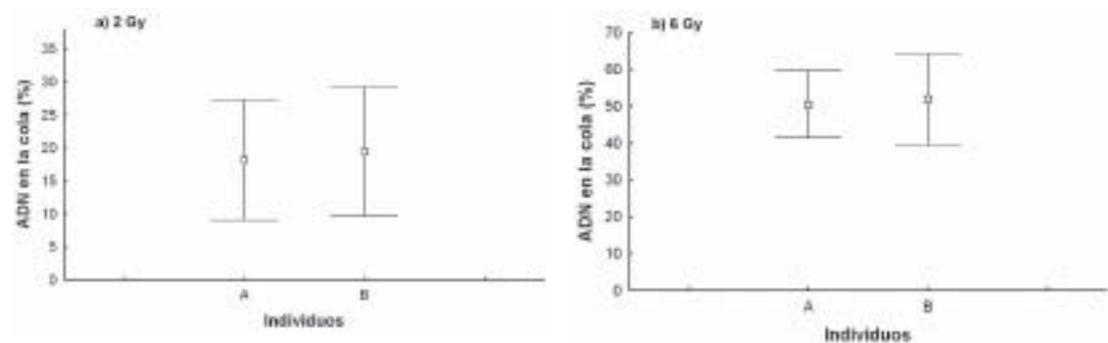


FIGURA 6. Ensayos de validación. Valores del daño radioinducido mediante el parámetro % ADN en la cola.

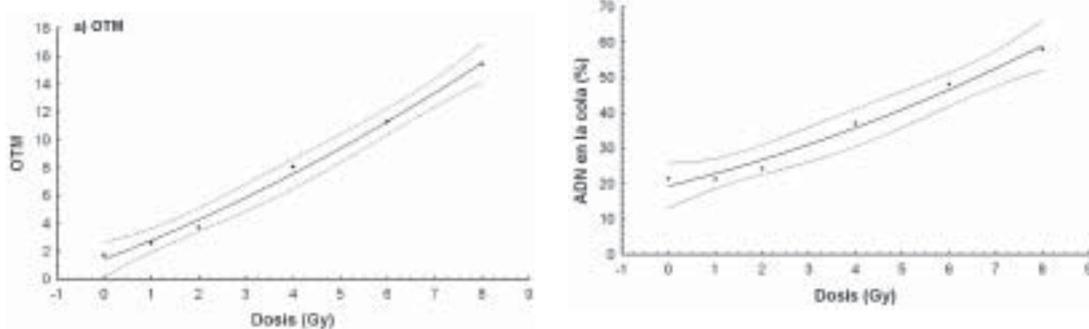


FIGURA 7. Intervalos de confianza de los parámetros de la curva de calibración en el rango evaluado ($\alpha=0.5$).

TABLA II. Resultados de validación. Valores indicativos de las dosis validadas en referencia a los valores de la calibración general para ambos individuos y para los parámetros añadidos.

		Dosis (Gy)		Valor en la curva		Límites de confianza ($\alpha=0.5$)	
		2 Gy	6 Gy	2 Gy	6 Gy	2 Gy	6 Gy
Medias	Individuo A	4,26±2,59	16,90±6,55	3,71	11,31	[2,49-4,89]	[9,64-12,98]
OTM±SD	Individuo B	3,53±2,49	15,91±4,80				
Medias	Individuo A	19,59±9,60	51,84±12,37	24,35	48,53	[22,38-26,32]	[47,10-49,37]
%ADN±SD	Individuo B	18,07±9,11	50,262±8,97				

DISCUSIÓN

Hasta el presente la mayoría de los trabajos realizados con curvas de calibración y radiaciones refieren al daño citogenético inducido que permite una estimación dosimétrica confiable (Lloyd, 1998; Schroder y Heimers, 2002; Natarajan y Kesavan, 2005). Así se destaca la utilización de las técnicas MN y ACE en la cuantificación de lesiones estables e inestables mediante la que se calcula la dosis de radiación recibida por un individuo. El enfoque innovador del presente tra-

bajo gira hacia la utilización de técnicas que permitan valorar la sensibilidad individual frente a radiaciones ionizantes. En relación a ello se propuso la utilización del ensayo cometa con el objetivo de obtener una idea del nivel de daño radioinducido en el rango de 0 a 8 Gy de rayos gamma. El mismo se presenta como una prueba rápida, sencilla y de bajo costo. Su alta sensibilidad en cuanto a la detección de daño genético lo posiciona preferencialmente en relación a metodologías citogenéticas clásicas (Moller, 2005; Lee y Steinert, 2003).

Desde otra perspectiva, los métodos de calibración estándar del ensayo propiamente dicho, se realizan de manera preferencial con radiaciones electromagnéticas (rayos X y gamma) (Collins, 2004). No obstante, en este punto es importante recordar que diversos autores sostienen que es necesaria una mejor estandarización y calibración de la técnica (Bocker *et al.*, 1997; Kassie *et al.* 2000; Lee *et al.*, 2004).

Consecuentemente a lo expuesto anteriormente, se presume la falta de acuerdo en la forma de las curvas dosis-respuestas sin poder argumentar claramente el origen de las discrepancias existentes. Así se entiende la necesidad de que cada laboratorio pueda contar con sus propias curvas de calibración evaluando los factores que inciden sobre la sensibilidad del método principalmente a bajas dosis de radiación y de bajo LET (Di Giorgio *et al.*, 1998; Barquinero *et al.*, 1995; Lloyd y Edwards, 1983). El esfuerzo conjunto de diferentes grupos de trabajo podría permitir disponer de distintas relaciones dosis-respuesta y observar si la forma general de las curvas es similar en todos los laboratorios o si existen diferencias importantes en la relación cuantitativa. De esta manera la unificación de criterios y metodologías de trabajo conduciría a las opiniones consensuadas necesarias para la mejor interpretación de los resultados.

El presente estudio permite coincidir con Collins (2004), dado que se observa un incremento significativo de daño a medida que aumentan las dosis en el rango evaluado. Este hecho sugiere, de acuerdo al modo de acción de este tipo de radiación y a la versión de la técnica empleada, un incremento importante de rupturas de hebra simple en la molécula de ADN. Las diferencias significativas entre dosis consecutivas evidencian que cada punto de la curva permite la discriminación del daño observado en relación a los valores particulares de cada dosis. Al respecto, mediante el ensayo de validación

realizado, se corroboró la utilidad de esta curva para la estimación de la radiosensibilidad de un individuo en particular, mediante la magnitud del daño observado para una dosis determinada.

En cuanto a la elección de los parámetros analizados en este trabajo, se menciona que fueron introducidos por Olive *et al.* (1990 y 1992) y Muller *et al.* en 1994 y han sido ampliamente usados en estudios de genotoxicología. No obstante, se recuerda la falta de uniformidad de criterios en cuanto a cuál de ellos es el más adecuado en la detección del daño (Lee *et al.*, 2004).

Se destaca que mediante la implementación de la técnica en su versión alcalina, pudo validarse la curva para dosis bajas, en referencia al OTM. La consideración particular de esta variable, para los dos individuos analizados "a ciegas" demostró un nivel de daño encuadrado dentro del intervalo de confianza calculado para esas dosis. Específicamente, para la dosis de 2 Gy, desde la perspectiva de la radiosensibilidad individual, el valor de 3,53 (individuo A) y el de 4,26 (individuo B) están contenidos dentro de los límites de confianza obtenidos (2,49-4,89). En referencia a la dosis más alta (6 Gy), cabe aclarar que dada la extrema sensibilidad del ensayo y la gran variabilidad de los datos para estos valores de dosis obliga a realizar un análisis particular que contemple el desvío. Así, los valores de ambos individuos (10,349 y 11,104) están contenidos dentro del intervalo de confianza calculado (9,636-12,976). La falta de validación en relación al segundo parámetro analizado, el % de ADN en la cola, podría ser atribuida a una mayor sensibilidad del mismo en referencia al agente en cuestión, lo cual estaría influyendo en la menor repetibilidad de los resultados. Adicionalmente, se observó un desvío a dosis bajas, particular para estos valores.

En referencia a los límites de detección de la técnica, para ambos parámetros, un alto

y variable grado de daño impide la correcta estimación de la dosis por encima de 8 Gy. Por otra parte, una alta sensibilidad del ensayo a dosis bajas, respecto de las convencionales en citogenética, posibilita proponerla como buena herramienta de detección de daño a bajos niveles de radiación.

Tanto resultados previos de nuestro laboratorio como la revisión del estado actual de la técnica, permiten presentar las distintas relaciones dosis-respuesta para rayos gamma. Se observa que la forma general de las curvas individuales es similar en casi la totalidad de los casos para ambos parámetros evaluados. En adición, una buena aproximación polinómica refuerza el tipo de respuesta esperado.

En cuanto a las curvas de calibración generales, si bien la aproximación polinómica es la que demuestra un mejor ajuste a los resultados, no puede descartarse el buen resultado de la aproximación lineal. Concluimos que para evaluaciones de radiosensibilidad en situaciones que ameriten este aporte podría ser apropiado utilizar la curva pool del OTM y en casos de determinaciones dosimétricas hasta 8 Gy utilizar el correspondiente término espontáneo de la curva como valor guía para estimar la respuesta individual relativa ante una dosis dada.

Se propone que la realización de este tipo de estudios en diferentes laboratorios, permitiría lograr interpretaciones consensuadas en cuanto al tipo de respuesta para este rango de dosis más allá de la implementación particular del ensayo en los distintos lugares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARQUINERO JE, BARRIOS L, CABALLIN MR, MIRO R, RIBAS M, SUBIAS A y EGOZCUE J (1995). Occupational exposure to radiation induces an adaptive response in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 67:187-91.
- BOCKER W, BAUCH T, MULLER WU Y STREFFER C (1997). Image analysis of comet assay measurements. *International Journal of Radiation Biology.* 72:449-460.
- COLLINS AR, DUSINSKA M, FRANKLIN M, SOMOROVSKA M, PETROVSKA H, DUTHIE S, FILLION L, PANAYIOTIDIS, M, RASLOVA K Y VAUGHAN N (1997). Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30: 139-146.
- COLLINS AR (2004). The comet assay for the DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology.* 26:249-261.
- Di Giorgio, M. ; Sardi, M. Busto, E.; Roth, B.; Menéndez, P; Bonomi, M.; Vallerga, M.; Taja, M. y Maizal, L (2003). Ensayos predictivos de la radiosensibilidad individual en linfocitos humanos. VI Congreso Regional de Seguridad Radiológica y Nuclear (9-13 noviembre), Lima, Perú.
- DI GIORGO M, NASAZZI NB Y Taja MR (1998). IV Congreso Regional en Seguridad Radiológica y Nuclear. La Habana, Cuba. Realizado entre el 19 y 23 de octubre de 1998. PUBLICADO EN PI-19/98. Autoridad Regulatoria Nuclear. Argentina. 117-121.
- DI GIORGIO M, NASAZZI N, TAJA MR, ROTH B, SARDI M, MENÉNDEZ P (2001) Ensayo de micronúcleos en linfocitos con bloqueo de la citocinesis como posible indicador de la respuesta del paciente a la radioterapia. *Memorias V Congreso Regional de Protección Radiológica y Seguridad-Congreso Regional IRPA. Recife -Pernambuco- Brasil.*
- FAIRBAIRN DW, OLIVE PL Y O'NEILL KL (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339:37-59.
- GUILLAMENT E, CREUS A, PONTI J, SABBIONI E, FORTANER S Y MARCOS R (2004). In vitro DNA damage by arsenic compounds in human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline comet assay. *Mutagenesis.* 19 (2):129-135.
- KASSIE F, PARZEFALL WY KNASMUELLERS S (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res.*463:13-31.
- LEE RF Y STEINER S (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and fresh water) animals. *Mutat Res.* 544:43-64.
- LEE E, EUNHA O, LEE J, SUL D Y LEE J (2004). Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitor-

- ing studies. *Toxicological Sciences* 81:121-132.
- LLOYD DC Y EDWARDS AA (1983). Chromosome aberration in human lymphocytes: effect of radiation quality, dose and dose rate. *Radiation-Induced Chromosome damage in Man* 23-49.
- LLOYD DC (1998). New developments in chromosomal analysis for biological dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry*, 77:33-36.
- MOLLER P (2005) Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin. Pharmacol.* 96(1):1-42.
- MULLER W, BAUCH T, STREFFER C, NIEDEREICHHOLZ F Y BOCKER W (1994). Comet assay studies of radiation induced DNA damage and repair in various tumor cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 65: 315-319.
- NATARAJAN AT Y KESAVAN PC (2005). Cytogenetics for dosimetry in cases of radiation accidents and assessing the safety of irradiated food material. *Current Science*, Vol. 89, N° 2. 360- 365.
- NASAZZI N, DI GIORGIO M Y TAJA MR (2000). Retrospective dosimetry using chromosome painting Proceed. IRPA X Congress Vol. I 223-228.
- OLIVE PL, BANATH JP Y DURAND RE (1990). Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet Assay". *Radiat. Res.* 122:86-94.
- OLIVE PL, WLODEK D, DURAND RE Y BANATH JP (1992). Factors influencing DNA migration from cells individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp.Cell.Res.* 198:259-267.
- OLIVE PL (1999). DNA damage and repair individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.* 75(4):395-405.
- SCHRODER H Y HEIMERS A (2002). Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by in vitro and in vivo X-rays. *Mutation Research.* 27;517(1-2):167-72.
- SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR Y SCHNEIDER EL (1988). A simple technique for quantitation of low levels of dna damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184-191.