

Universidad Nacional de Costa Rica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

Desarrollo y análisis de la curva de calibración dosis-efecto
automatizada para rayos X de baja dosis a partir del ensayo de
micronúcleos con bloqueo de la citocinesis

Trabajo Final de Graduación para optar al grado de Maestría en Física
medica

Sustentante: Julián Alonso Gómez Castro

Modalidad de Graduación: Proyecto de Graduación

Campus Omar Dengo

Heredia, 2025

Este trabajo de graduación fue Aprobado por el Tribunal Examinador

Del departamento de Física de la Universidad Nacional como requisito para optar por el grado de Maestría en Física médica.

Ph.D. David Chacón Obando

Coordinador de la Maestría en Física Medica

M.Sc. Fabio Andrés Chaves Campos

Tutor(a)

M.Sc. Luis Pablo Arce Corrales

Revisor

M.Sc. Dagoberto González López

Revisor

M.Sc. Anthony Cordero

Asesor(a)

Agradecimientos

Agradezco profundamente a Dios y mi familia en primer lugar, por todo el apoyo durante este proceso profesional y académico, al grupo de investigación del Servicio de Dosimetría Biológica del Instituto de Investigaciones en Salud de la Universidad de Costa Rica, mi tutor M.Sc. Fabio Andrés Chaves Campos, y al Sr. Fernando Ortíz Morales. Asimismo, al grupo docentes e investigadores del departamento de física de la Universidad Nacional de Costa Rica, Lic. Luis David Badilla, Dr. Giovanni Sáenz y docentes de la maestría en física médica, M.Sc. Antony Cordero, M.Sc Luis Pablo Arce, M.Sc. Dagoberto González, Dra. Xiomara Márquez y Dr. David Chacón, a todos gracias por su paciencia, motivación y ayuda en el desarrollo profesional de mi maestría culminando en este trabajo.

Dedicatoria

El presente trabajo es dedicado especialmente a mi madre María Clementina Castro Aguilar, a mis tías Ana María Castro Aguilar, Rafaela Lucia Castro Aguilar y mi abuelita materna María Idali Aguilar Chacón, por todo su amor, comprensión, paciencia y apoyo incondicional durante mi vida, a quienes les debo todo y por quienes sigo adelante. Además de todas mis mascotas quienes son y siempre serán parte de mí y de mi familia, en especial a; Tyler, Tamara, Bandido, Duke, Suertuda, Blanca, Canela, Maggy, Mami, Café, Lucia, Felpuda, Copito, Nube, Manito, Octavio, Pomposo, Gris, Alicia, Laura, Leo y Luca.

Índice General

Miembros del tribunal.....	II
Agradecimientos.....	III
Dedicatoria	IV
Índice General	V
Índice de Cuadros	VI
Índice de Figuras.....	VII
Abreviaturas	VIII
1. Introducción	1
1.1 Justificación.....	4
1.2 Objetivos	6
1.2.1. Objetivo general	6
1.2.2. Objetivos específicos	6
2. Marco metodológico	6
2.1. Toma e irradiación de muestras de sangre.....	6
2.2. Ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis.....	8
2.3. Análisis microscópico	9
2.4. Análisis estadístico.....	10
3. Resultados	11
4. Discusión.....	18
5. Conclusiones.....	23
6. Recomendaciones.....	25
7. Fuente de financiamiento	26
8. Conflicto de intereses	26
9. Referencias	27

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Frecuencia de micronúcleos a través de las dosis de rayos X.....	11
Cuadro 2. Resumen del ajuste del modelo NB1 (binomial negativo tipo 1) para la frecuencia de micronúcleos en función de la dosis de radiación	13
Cuadro 3. Coeficientes estadísticos del modelo matemático NB1.....	15
Cuadro 4. Coeficientes estadísticos de la construcción de curvas de calibración dosis-efecto en ensayos automatizados y semiautomatizados de micronúcleos en otras investigaciones.	16

Índice de Figuras

Figura 1. Figura 1. Representación gráfica del comportamiento de la aparición de micronúcleos (MN) y frecuencia de micronúcleos por célula binucleada (NMNBN) respecto al incremento de dosis irradiada.....	12
Figura 2. Curva dosis-respuesta de micronúcleos a diferentes dosis de rayos X (puntos circulares) con límites de confianza al 95 % (área sombreada) utilizando el ensayo CBMN en linfocitos humanos	14

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIC	Criterio de Información de Akaike
ARN	Ácido ribonucleico
BD	Biodosimetría citogenética
BN	Células Binucleadas
CBMN	Ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
CD	Cromosomas dicéntricos
INISA	Instituto de Investigaciones en Salud
LBDNet	Dosimetría Biológica de América Latina
ML	Aprendizaje automático
MN	Micronúcleos
NB	Regresión binomial negativo
NB1	Modelo binomial negativa #1
NB2	Modelo binomial negativa #2
NMNBI	Número medio de MN por célula binucleada
RI	Radiaciones Ionizantes
OIEA	Organización internacional de energía atómica
PCCr	Ensayo de condensación prematura de cromosomas
RI	Radiación ionizante
SAD	Source-to-Axis Distance (Distancia de la Fuente al Eje)
U	U de Papworth

Resumen:

En biodosimetría, el desarrollo de curvas de calibración dosis–efecto en ensayos con biomarcadores, es fundamental para la correcta estimación de las dosis sobre sujetos expuesto a radiaciones ionizantes, en metodologías como la de estimación mediante el ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN), el análisis automatizado ha permitido mejorar los tiempos, confiabilidad y precisión en conteo e interpretación de grandes volúmenes de datos, mejorando la exactitud de dichas dosis, por lo tanto, este trabajo estableció la primer implantación de un análisis automatizado en el conteo de micronúcleos (MN) en el país, brindando un referente regional en biodosimetría citogenética. Se irradiaron muestras de sangre de seis donantes sanos en siete niveles de dosis (0–4 Gy) y dos muestras ciegas (1.5 y 3 Gy), utilizando un acelerador lineal UNIQUE a 6 MV. El ensayo CBMN se realizó siguiendo los protocolos del OIEA; las láminas teñidas con DAPI se analizaron utilizando un microscopio automatizado Axiolmager Z2 integrado con el sistema Metafer4 de MetaSystems y el clasificador MNScoreX. Para el ajuste del modelo se empleó una regresión binomial negativa (NB1). El análisis automatizado mostró un aumento dependiente de la dosis en la frecuencia de MN. El modelo ajustado presentó una relación lineal–cuadrática: $Y = 0.0545 + 0.0448 \cdot D + 0.0145 \cdot D^2$, con todos los coeficientes estadísticamente significativos ($p < 0.001$). Las estimaciones de dosis para las muestras ciegas (1.5 y 3 Gy) coincidieron con las dosis reales dentro de los intervalos de confianza del 95%, con puntajes $Z < |3|$. La curva permitió una estimación precisa de las dosis en las muestras incógnitas, cumpliendo con los criterios de validación. Estos resultados destacan el uso de microscopía automatizada con modelos estadísticos robustos para lograr evaluaciones de dosis confiables, ya sea en ensayos dosimétricos o situaciones de emergencia radiológica.

Palabras clave: Radiaciones ionizantes, Biodosimetría, Micronúcleos, Curva automatizada, protección radiológica, radiobiología.

1. Introducción

La dosimetría biológica (DB) se refiere a técnicas que evalúan la exposición a radiaciones ionizantes (RI) mediante el análisis de marcadores biológicos de daño genético, estos métodos estiman los niveles de exposición, evalúan los riesgos asociados y establecen relaciones entre las dosis recibidas y sus efectos biológicos (Aryankalayil et al., 2023). Estas relaciones se representan a través de fórmulas matemáticas y curvas dosis-efecto diseñadas para predecir la dosis absorbida resultante de una sobreexposición a la radiación ionizante, basándose en el análisis de variables biológicas específicas (Sommer et al., 2020). Uno de los ensayos más ampliamente implementados, es el ensayo de micronúcleos con bloqueo de citoquinesis (CBMN), en donde se evalúa la formación de micronúcleos (MN), que son estructuras que se originan por la formación de fragmentos cromosómicos o por la no incorporación de cromosomas enteros en el núcleo principal durante la mitosis, en donde la adición de citocalasina B, inhibir la citocinesis lo que permite identificar únicamente las células que han pasado por una división tras la exposición y cuantificar la frecuencia de MN en ellas (Fenech, 2020).

Esta técnica técnica es complementaria al ensayo de cromosomas dicéntricos (CD), la técnica de referencia actual en DB, el ensayo CBMN ofrece varias ventajas, incluyendo costo-efectividad, simplicidad y análisis rápido, lo que en conjunto lo convierte en una herramienta versátil para su uso en laboratorios de biodosimetría (Vral et al., 2011; Lusiyanti et al., 2016). El ensayo CBMN se utiliza con frecuencia como un ensayo general en toxicología, sin embargo, dado que la radiación es un potente agente clastogénico para inducir micronúcleos, el ensayo CBMN ha demostrado ser muy fiable para evaluar exposiciones *in vivo*, determinando la radiosensibilidad y la susceptibilidad al cáncer *in vitro* (I.A.E.A., 2011; Sommer et al., 2020). Entre las desventajas del ensayo se encuentran la variabilidad inherente

en la frecuencia basal de micronúcleos, su rendimiento limitado al estimar dosis para exposiciones *in vivo* de 0.2–0.3 Gy de rayos X y su susceptibilidad a variables de confusión, para abordar estas limitaciones se han propuesto varias mejoras técnicas, lo que mitiga estos desafíos (Tucker et al., 2013).

El recuento automatizada o semiautomatizada de MN presenta una oportunidad para reducir los tiempos de respuesta de los laboratorios de biodosimetría, al mismo tiempo que se mitiga el sesgo subjetivo en el análisis, la implementación de sistemas de microscopía automatizada permite la identificación y clasificación de células binucleadas (BN) y micronúcleos, facilita la medición de parámetros morfológicos y mejora la eliminación de artefactos, lo que mejora la precisión y eficiencia del análisis (Beinke et al., 2015; Rodrigues et al., 2018).

A manera de recuento, desde la década de 1990, los estudios en MN buscaron el uso de sistemas para la digitalización de imágenes a través de la microscopía de fluorescencia y la implementación de modos de análisis de densidad óptica, mejorando la discriminación entre material nuclear y citoplasmático, el reconocimiento de núcleos principales de MN, las mediciones de área, el contenido de ADN y parámetros morfológicos (Asano et al., 1998; Stich et al., 1990). En la siguiente década, nuevos estudios evaluaron la capacidad de los sistemas de microscopía automatizada sobre los manuales, para puntuar MN a través de software comercial y estaciones de trabajo, como Pathfinder LightVision, CELLSCAN (Decordier et al., 2008) y Metafer 4 (Varga 2004; Thierens & Vral, 2009; Willems et al., 2010), que permiten la evaluación masiva de muestras, reduciendo las validaciones secundarias, minimizando artefactos y aumentando el triaje poblacional. En años posteriores sistema como el IN Cell Analyzer 2000 o Operetta™ HCS, buscaron mejoras a través del cribado avanzado, algoritmos de clustering y métodos bayesianos para considerar múltiples parámetros simultáneamente e identificar patrones complejos en la presencia o ausencia de

núcleos principales y micronúcleos, así como ARN y definir los diversos orígenes de estos MN (Shibai-Ogata et al., 2014; Huang et al., 2018). En los últimos años, la automatización ha implementado modelos de aprendizaje profundo utilizando bases de datos para conteos automatizados permitiendo realizar pruebas a inter e intralaboratorios lo que ha resultado en una mayor precisión en la reconstrucción de dosis (Wills et al., 2021; Shuryak et al., 2022).

Todos estos progresivos avances han buscado mejorar la implementación de la BD, repercutiendo a nivel centroamericano en servicios de dosimetría biológica, como el del instituto de investigaciones en salud (INISA) de la Universidad de Costa Rica, donde se han realizado los primeros ensayos en establecer curvas dosis efecto, primeramente en cromosomas dicéntricos, para rayos gamma, y en ensayos mediante análisis de PCCr para altas dosis de rayos X, implementando sistemas de microscopía automatizada (Metasystems Metafer), además de desarrollar análisis comparativos con otros laboratorios para CD, dentro de la red de dosimetría biológica de América Latina (LBDNet), creando criterios conjuntos en estimaciones de dosis (Valle Bourrouet et al., 2022; Chaves-Campos et al., 2024; González Mesa et al., 2024; Romero et al., 2025). Estos trabajos buscan gradualmente, el uso de nuevas técnicas que permitan mejorar los alcances de servicios regionales, para brindar resultados de mayor confianza y de respuesta más rápida en situaciones de exposición.

En función a lo anterior, el presente estudio describe el desarrollo de una curva de calibración dosis-efecto para exposiciones a rayos X (0-4 Gy) utilizando el ensayo de micronúcleos de bloqueo de citocinesis (CBMN) combinado con microscopía automatizada, lo que representa el primer informe de este tipo en América Latina, estableciendo un referente para enfoques de alto rendimiento en dosimetría biológica, destacando su potencial para mejorar la eficiencia y reducir sustancialmente los tiempos de respuesta en emergencias radiológicas.

1.1 Justificación

La implementación de ensayos de biodosimetría busca proporcionar estimaciones confiables de dosis absorbidas, donde la dosimetría biológica ayuda a definir, de mejor manera, el estado del paciente, como complemento de la dosimetría física y la evaluación médica, corroborando si la exposición se ha producido o no, en especial si la persona involucrada no portaba dosímetro físico, y si dicha exposición es comprobada, estimando la dosis recibida en función del tipo de radiación (Castro, 2013).

La aplicación de biodosimetría mediante herramientas de automatización, en ensayos el de MNBC, DC o PCCr, minimiza la variabilidad, optimizando el triaje poblacional y reduciendo errores como la discrepancias entre analistas, asociada al conteo manual, maximizando la posible cantidad de muestras procesadas por día de verlo de esa manera, lo cual resulta esencial tanto en situaciones de emergencia radiológica o accidentes radiológicos, aunque son poco comunes, pueden afectar a todas las categorías de la población, público en general y trabajadores del área de salud (Balajee et al., (2019); Wills et al., (2021)).

El laboratorio de citogenética del INISA-UCR, hasta la presente, es el único laboratorio trabajando en dosimetría biológica en Costa Rica y Centroamérica, el mismo forma parte de la Red Latinoamericana de Laboratorios de Dosimetría Biológica (LBDNet), de gran importancia en colaboraciones y trabajo en equipo en respuestas a posibles casos de accidentes que involucran un grupo masivo de personas. Dicho servicio ha desarrollado las primeras curvas de calibración dosis-efecto, en ensayos de cromosomas dicéntricos de 0 a 5 Gy (Valle Bourrouet et al., 2022) y condensación prematura de cromosomas de 0 a 17,5 Gy (Chaves et al., 2024) y ha colaborado en el desarrollo de trabajos comparativos a nivel

interlaboratorio en cromosomas dicéntricos (González Mesa et al., 2024; Romero et al., 2025), no obstante para el servicio de dosimetría es necesario ampliar y mejorar la elaboración de curvas calibración con diferentes biomarcadores y con mejoras en el manejo de criterios de evaluación, capacidad de procesamiento y precisión del análisis, siendo la implementación de los ensayos de micronúcleos ligados con los procesos de automatización, esenciales para dicho crecimiento y para el aumentando de la capacidad del laboratorio en respuesta a diferentes necesidades; alta carga de muestras, monitoreos de exposición leves o medias, y al realizar validaciones rápidas.

Por lo tanto, el desarrollo y elaboración de una primera curva de calibración dosis-efecto de CBMN por rayos X a bajas dosis mediada por procesamiento automatizado, brindaría a el laboratorio, una mejora en la eficiencia del análisis de parámetros y criterios, en la correlación directa entre indicadores citogenéticos y dosis recibidas, y en las estimaciones de los efectos biológicos. Por lo tanto, que a partiendo de este primer estudio automatizado, su implementación podría reducir los tiempos de trabajo con una mayor sensibilidad y especificidad en estudios biodosimétricos futuros.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Elaborar una curva de calibración dosis-efecto para rayos X mediante análisis automatizado del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis para la estimación de dosis absorbidas en muestras de sangre periféricas.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Ejecutar la irradiación de muestras de linfocitos en sangre periférica, a siete niveles de dosis de 0 a 4 Gy mediante el uso de un acelerador lineal a 6MV
2. Realizar con las muestras irradiadas el ensayo de CBMN y subsecuente conteo de MN por microscopia de fluorescencia automatizada.
3. Construir la curva dosis-efecto mediante análisis estadístico de las frecuencias de MN a distintas dosis y evaluar su ajuste empleando índices estadísticos y estimaciones de dosis incógnitas

2. Marco metodológico

2.1. Toma e irradiación de muestras de sangre.

Se tomaron siete muestras de sangre periférica de 5 ml cada una en tubos heparinizados para cada uno de los seis participantes (tres hombres y tres mujeres), quienes dieron su consentimiento informado. Las muestras para la construcción de la curva se irradiaron a: 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 y 4 Gy, y para su validación, se realizaron dos muestras incógnitas irradiadas a 1.5 y 3 Gy (codificadas como X e Y). Las muestras se colocaron dentro de un maniquí de agua de 30 cm x 30 cm (PTW, Friburgo, Alemania), colocadas en un soporte central ubicado a 15 cm de cada pared lateral y sumergidas a 15 cm en agua a una temperatura de 37 ± 0.5 °C, y lleno al 80% de la capacidad. Para la irradiación de la muestra, se utilizó un acelerador lineal Varian Medical Systems (CA, EE. UU.), perteneciente al servicio

de radioterapia del Hospital México, dicho acelerador se calibró de acuerdo con las recomendaciones del Informe Técnico No. 398 del OIEA (TRS 398). Se ajustaron los parámetros para un haz de fotones de 6 MV a una tasa de dosis de 1 cGy/UM, la irradiación se llevó a cabo utilizando una distancia fuente-eje (SAD) de 100 cm con dos campos laterales opuestos orientados a 90° y 270°, cada uno de los cuales de 10 x 10 cm. La ecuación 1 presenta el cálculo de las unidades de monitorización (MU) para cada campo; (La heterogeneidad del campo no se tuvo en cuenta en este cálculo ni en los análisis posteriores).

(Ecuación 1)

$$UM = \frac{D(cGy)}{D_{W,Ref} * S_c * S_p * T_{d\ effective}^{L\ effective} * F_{wedge} * F_{tray} * F_{OCR} * F^{ISF}}$$

$D(cGy)$: Valores de dosis designados

$D_{W,Ref}$: Dosis absorbida en agua bajo condiciones de referencia

S_c : Factor de calibración del colimador

S_p : Factor de dispersión del fantoma

$T_{d\ effective}^{L\ effective}$: Producto de los factores de atenuación por el trayecto efectivo y la longitud efectiva

F_{wedge} : Factor de corrección por el uso de cuña

F_{tray} : Factor de atenuación para las bandejas de colimación de referencia.

F_{OCR} : Factor de corrección por relación fuera del centro (Off-Center Ratio, OCR).

F^{ISF} : Factor de ajuste de la intensidad del haz basado en el principio de la ley del inverso del cuadrado de la distancia

UM: Unidades monitor

Para garantizar la estabilidad de la temperatura de las muestras de sangre después de la irradiación y durante el transporte entre centros, se utiliza una incubadora portátil modelo INB-203M Portable CO₂ (Se empleó un equipo de IKS International, Países Bajos. Con una capacidad de 15 L, la cual facilitó la manipulación y el transporte seguros de las muestras en un entorno controlado a 37 ± 0.5 °C. Tras la irradiación, las muestras se llevaron al laboratorio de citogenética del INISA-UCR donde fueron incubadas a la misma temperatura mencionada durante aproximadamente dos horas, lo que proporcionó el tiempo suficiente para la activación de los mecanismos de respuesta al daño celular del ADN.

El protocolo de investigación fue analizado minuciosamente y recibió la aprobación del Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica (UCR). Antes de proceder a la recolección de muestras, se proporcionó una explicación detallada sobre la participación de los donantes y el uso previsto de las muestras. Toda la información personal fue anonimizada, y los procedimientos de codificación fueron accesibles exclusivamente al investigador principal.

2.2. Ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis

El cultivo de linfocitos, la recolección de células, la preparación de extensiones de cromosomas y el análisis citogenético se realizaron de acuerdo con el protocolo descrito por el IAEA, (2011). Inicialmente, se añadió un volumen de 0.5 mL de sangre completa de cada muestra a tubos cónicos, cada uno con 4.5 mL de medio de cultivo PBMax (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) suplementado con fitohemaglutinina PHA, (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), al 3 %, posteriormente, los tubos se incubaron a 37 ± 0.5 °C en atmósfera de CO₂ al 5 % durante 72 horas. Transcurridas 24 horas se añadió citocalasina B (Cyt-B) a una concentración final de 6 µg/mL a partir de una solución madre de 2 mg/mL preparado en DMSO (Merck,

EE. UU.). Las células se recolectaron 3 días después del inicio del cultivo (72 horas) y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos para eliminar el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió y se trató con 7 ml de KCl (0.075 M) (MerK EE. UU.) a 4 °C y se homogeneizó por inversión. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 5 mL de fijador recién diluido (metanol: ácido acético [10:1]) en una proporción 1:1 con solución de Ringer (4.5 g de NaCl, 0.21 g de KCl y 0.12 g de CaCl₂ en 500 mL de H₂O). La suspensión celular se agitó en vórtex para evitar la formación de grumos, posteriormente, el pellet celular se fijó al menos tres veces con fijador frío recién preparado hasta que adquirió un aspecto blanquecino, durante la fijación final se retiró cuidadosamente el sobrenadante, dejando aproximadamente 1 mL de líquido por encima del pellet, a continuación, las células se resuspendieron con cuidado y se transfirieron cuidadosamente 25 µL de la suspensión.

Las muestras se transfirieron a portaobjetos limpios con una pipeta de volumen fijo, los portaobjetos se secaron al aire antes de teñirlos con la solución Vectashield DAPI (Merck, EE. UU.).

2.3. Análisis microscópico

El proceso de captura de imágenes se realizó con un microscopio automatizado Axio Imager Z2 (Carl-Zeiss, Noruega), equipado con el software Metafer4 versión 4.3.7 (MetaSystems, Alemania). El análisis automatizado se realizó con el clasificador MNScoreX versión 4.3.7 (MetaSystems, Alemania), que considera criterios específicos para clasificar un objeto como una célula binucleada, a razón de ejemplo, considerando a una célula como binucleada cuando contiene dos núcleos de forma similar, separados por una distancia absoluta máxima de 250 (medida en 0.1 µm). El conjunto completo de parámetros utilizados por el software para identificar células binucleadas y micronúcleos se proporciona en los documentos complementarios MNScoreX. Después del análisis de imágenes, se registró la distribución de células BN por número de MN y el recuento total de MN

por dosis, para dosis de 0, 0.25, 0.5 y 1 Gy, se analizó un mínimo de 2000 células BN por muestra, para dosis superiores a 1 Gy, se contabilizaron al menos 1000 células BN por caso para la construcción de la curva, en las muestras incógnitas se realizaron estimaciones tomando los recuentos de 1000 y 200 células tanto para la incógnita X como para la Y (ISO 17099:2014).

2.4. Análisis estadístico

El procesamiento estadístico de los datos para el ajuste de la curva de calibración, la estimación de las dosis desconocidas, el cálculo de las estadísticas de dispersión para el ajuste de la calibración y el análisis gráfico se realizaron utilizando el lenguaje R versión 4.3.2 (2023-10-31 ucrt). Para modelar la relación entre la dosis de radiación y la frecuencia de MN, se utilizó un modelo de regresión binomial negativa (NB1), el cual cuenta la sobre dispersión de los datos, donde la varianza excede la media. La selección del modelo se basó en el Criterio de Información de Akaike (AIC), la desviación residual y la significancia de los coeficientes estimados, además la evaluación de la curva se realizó mediante criterio de errores absoluto y relativo, así como el cálculo de puntuaciones z. Para la dosis desconocida, el criterio de aceptación evaluó que dosis estimada por dosimetría biológica no debía desviarse en más del 20% de la dosis determinada por dosimetría física (ISO, 2022).

3. Resultados

Los datos de MN observados a distintas dosis de irradiación, junto con la distribución de células binucleadas, clasificadas según el número de MN y valores estadísticos del estudio, se presentan en el cuadro 1 y figura 1 (representativa del comportamiento), se observó un claro incremento en la frecuencia de MN a medida que aumenta la dosis de rayos X. Los valores del estadístico de sobredispersión U mostraron una variabilidad mayor a la esperada en una distribución típica de Poisson para formación de MN en exposiciones homogéneas.

El número medio de MN por célula binucleada aumento con la dosis, pasando de 0.0485 en 0 Gy a 0.4745 en 4 Gy, comportamiento visible mediante la representación gráfica de la figura 1, lo que refleja un daño cromosómico progresivamente mayor con exposiciones más intensas. Paralelamente, la varianza también aumenta, de 0.0522 a 0 Gy a 0.5293 a 4 Gy, lo que indica no solo un mayor recuento de MN, sino también una mayor heterogeneidad en la respuesta celular a la radiación.

Cuadro 1: Frecuencia de micronúcleos a través de las dosis de rayos X. Dosis administrada (Dosis), Células binucleadas totales (BNt), total de células con MN (MN totales), cantidad de células según su número de micronúcleos (0 a 6), número medio de MN por célula binucleada (NMNBI), varianza (var), índice de dispersión (DI), U de Papworth (U).

Dosis (Gy)	BNt	MN totales	Cantidad de células segun número de micronúcleos								NMNBI	var	DI	U
			0	1	2	3	4	5	6					
0	14828	719	14154	629	45	0	0	0	0	0.0485	0.0522	1.0768	6.61	
0.25	14793	1090	13815	877	94	4	2	1	0	0.0737	0.0856	1.1613	13.87	
0.5	15727	1249	14611	1000	103	11	1	0	1	0.0794	0.0931	1.1721	15.26	
1	13807	1702	12363	1239	167	25	11	2	0	0.1233	0.1556	1.2622	21.80	
2	7833	1329	6691	984	133	22	2	1	0	0.1697	0.1973	1.1631	10.207	
3	8379	2741	6290	1530	475	75	9	0	0	0.3271	0.4001	1.2232	14.447	
4	7226	3429	4648	1865	594	102	16	0	1	0.4745	0.5292	1.1153	6.93	

El cuadro 1 destaca una relación dosis-respuesta clara en la frecuencia de micronúcleos (MN), junto con cambios notables en el patrón de distribución y un incremento de la variabilidad en su formación, además se observa una disminución en el número de células binucleadas viables a dosis más altas, con un aumento en la proporción de células binucleadas con dos o más MN, siendo 0 Gy, solo el 6,7 % de las células como MN-positivas con presencia de más de una MN, mientras que esta cifra supera el 36 % a 4 Gy. Esta tendencia respalda la idea de que dosis más altas de radiación inducen daño cromosómico no solo más frecuente, sino también más grave en células individuales.

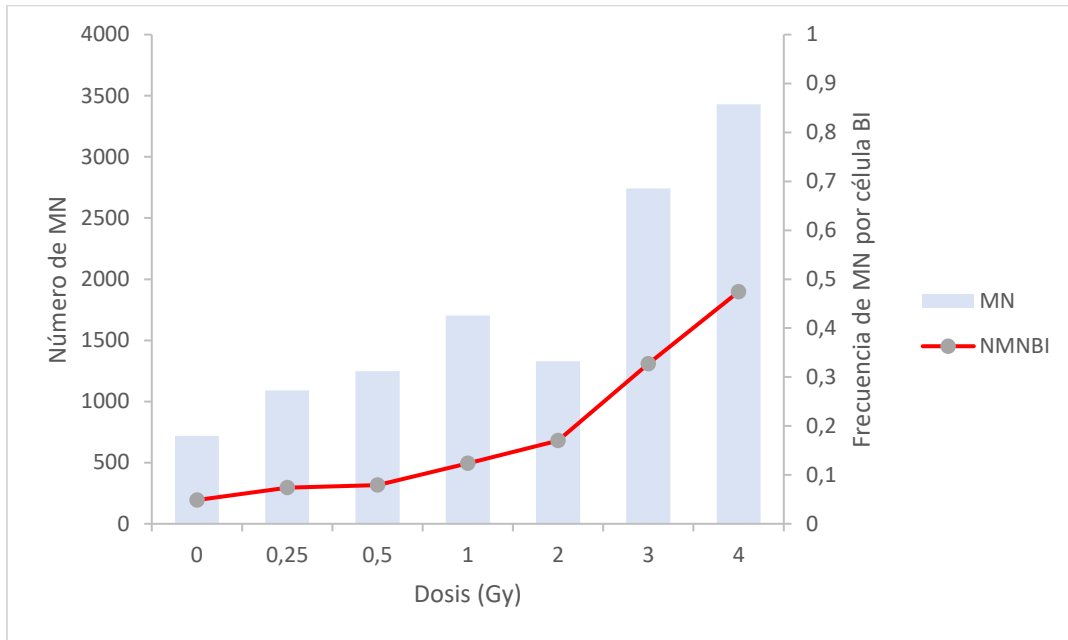


Figura 1. Representación gráfica del comportamiento de la aparición de micronúcleos (MN) y frecuencia de micronúcleos por célula binucleada (NMNBI) respecto al incremento de dosis irradiada.

La curva dosis-respuesta de la figura 2, se generó para linfocitos humanos expuestos a rayos X, empleando datos obtenidos mediante análisis automatizado, donde los coeficientes mediante la aplicación del modelo binomial negativo se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Resumen del ajuste del modelo NB1 (binomial negativo tipo 1) para la frecuencia de micronúcleos en función de la dosis de radiación.

Coficiente	Estimación	Error estandar (SE)	z value	p-value
C	0.054458	0.005267	10.340	$< 2e^{-16}$
α	0.044763	0.012431	3.601	0.000317
β	0.014543	0.003736	3.893	$9.9e^{-05}$

Coeficiente Estimación Error estandar (SE) z value p-value

Esta curva se construyó con base en 82 593 células analizadas en siete puntos de dosis. La frecuencia de MN (Y) siguió una relación lineal-cuadrática con la dosis absorbida (D), conforme a la respuesta biológica esperada ante la radiación representada por la ecuación:

(Ecuación 2)

$$Y = (0.054458 \pm 0.005267) + D \times (0.044763 \pm 0.012431) + D^2 \times (0.014543 \pm 0.003736)$$

(Termino independiente)

(Termino lineal)

(Termino cuadrático)

El modelo binomial negativo (NB1) se ajustó adecuadamente a los datos, siendo todos los coeficientes del modelo estadísticamente significativos ($p < 0.01$), con un AIC de 96.2 y un parámetro de dispersión de 10.4 (Cuadro 3). La prueba de razón de verosimilitudes que comparó NB1 con NB2 arrojó un valor p de 1.000, lo que indica que no se mejora el ajuste del modelo al cambiar la parametrización.

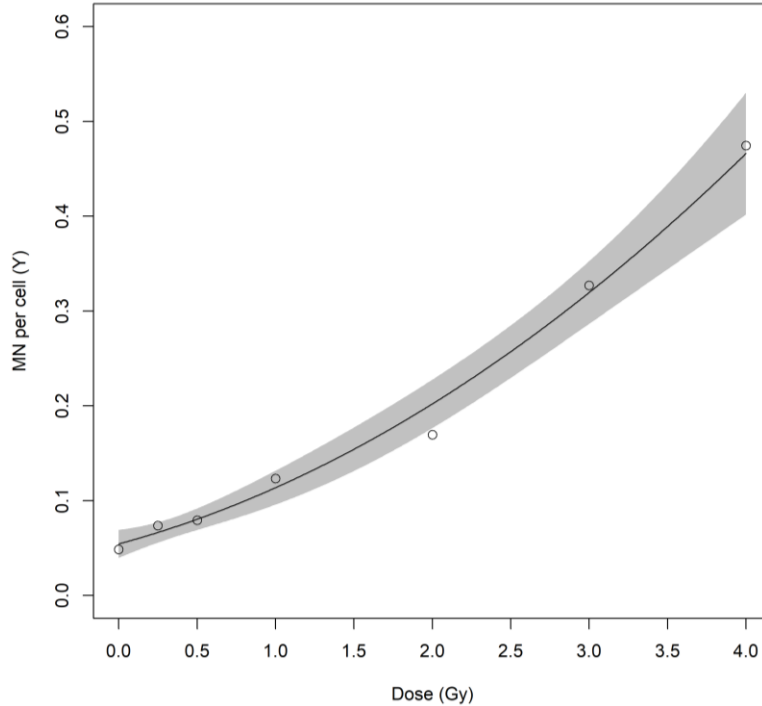


Figura 2. Curva dosis-respuesta de micronúcleos a diferentes dosis de rayos X (puntos circulares) con límites de confianza al 95 % (área sombreada) utilizando el ensayo CBMN en linfocitos humanos.

Cuadro 3. Coeficientes estadísticos del modelo matemático NB1. Criterio Akaike (AIC), criterio bayesiano (BIC), logaritmo de la verosimilitud del modelo (LogLik), (transformada del logLik ($-2 \cdot \log(L)$)), grados de libertad (df. Resid), parámetro de dispersión del modelo binomial negativo tipo 1 (Dp NB1).

AIC	BIC	logLik	$-2 \cdot \log(L)$	df. resid	Dp NB1
96.2	96	-44.1	88.2	3	10.4

Las estimaciones de dosis, frecuencias y estadísticos de las 2 muestras incógnitas irradiadas a 1.5 y 3 Gy se muestran en el cuadro 3, se evaluó para cada dosis una

estimación para los números aproximados a 200 y 1000 células binucleadas. Los valores del estadístico (Z score) se mantuvieron dentro del rango aceptable para todas las estimaciones ($-3 < Z < 3$). Las condiciones de irradiación y manejo celular se realizaron en las mismas condiciones de irradiación y cultivo de linfocitos de la muestra utilizadas para generar la curva de calibración.

Cuadro 4. Estimación de dosis administrada a las muestras incógnitas. Dosis incógnita (DA), criterio del número de células binucleadas para estimación (NC), número de células binucleadas utilizadas para la estimación (CB), total de células con MN (total MN), Intervalo de confianza superior 95 % (DL), dosis incógnita estimada (DE), Intervalo de confianza superior 95 % (DU), valor del estadístico z asignado (Z-score).

DA (Gy)	NC	CB	Total MN	Distribución de Células acorde al número de MN						DL (Gy)	DE (Gy)	DU (Gy)	Z- score
				0	1	2	3	4	5				
1.5	200	279	41	244	30	4	1	0	0	0,66	1,42	2.26	-0.8
	1000	1059	286	928	114	13	4	0	0	0,88	1,38	1,93	-1.2
3	200	207	73	147	49	9	2	0	0	2.42	3.23	4.33	1.15
	1000	1037	286	802	193	35	6	0	1	2,14	2.65	3.22	1.75

A fin de aumentar los criterios finales comparativos con otras investigaciones que han implementado diversos sistemas de análisis semi y automatizados, el cuadro 5 muestra diversos valores involucrados en la construcción de curvas de calibración por otros grupos de investigación implementando el análisis por micronúcleos, donde se muestran coeficientes cercanos a las magnitudes presentadas en esta investigación visibles en el cuadro 2.

Cuadro 4. Coeficientes estadísticos de la construcción de curvas de calibración dosis-efecto en ensayos automatizados y semiautomatizados de micronúcleos en otras investigaciones.

Referencia	Sistema de obtención de imágenes	Sistema de análisis de MN	Fuente de radiación (Energía / rango de dosis)	Dosis (Gy)	C±SE	α±SE	β±SE
El presente trabajo	Microscopio de fluorescencia	Metafer4 versión 4.3.7 MNScoreX versión 4.3.7	Linac (Nominal 6 MV; 1 Gy/min)	0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4	0.0544 ± 0.0052	0.0447 ± 0.012	0.0145 ± 0.003
(Baeyens et al., 2011)	Microscopio de fluorescencia combinada con técnica FISH	Metafer 4 MNScore	Co-60 (avg. 1.25 MeV; 1.52 Gy/min)	0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 2	0.0303 ± 0.0015	0.0207 ± 0.0076	0.0280 ± 0.0047
(Repin et al., 2019)	Estación de trabajo PerkinElmer cellexplorer	GE Healthcare IN Cell Analyzer 2000.	Cs-137 (avg. 0.662 MeV; 0.7 Gy/min)	0, 1, 2, 3, 4, 5	0.0143 ± 0.0038	0.0457 ± 0.0081	0.0039 ± 0.0021
(Shuryak et al., 2022)	PerkinElmer cell::explorer;	BioTek Cytation Cell Imaging Multi-Mode Reader, FluorQuant v6.1.	Linac (Nominal 6–9 MV; 1 Gy/min)	0, 3, 8	3.19×10 ² ± 1.6×10 ⁻³	9.6×10 ² ± 5.04×10 ⁻³	1.05×10 ² ± 9.4×10 ⁻⁴
(Lee et al., 2023)	Microscopio de fluorescencia	MetaSystems Metafer 4 MNScore	Co-60 (avg. 1.25 MeV; 0.5 Gy/min)	0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4	0.0178 ± 0.0016	0.0237 ± 0.0039	0.0080 ± 0.0012

4. Discusión

Los sistemas de microscopía automatizada integrados con software avanzado de reconocimiento de patrones se han vuelto cada vez más comunes en laboratorios de dosimetría biológica, estas tecnologías permiten digitalizar portaobjetos completos, identificando de forma automática células y aberraciones cromosómicas generando informes sobre la frecuencia de los biomarcadores, la construcción de curvas dosis-respuesta a partir de estos análisis agiliza el proceso y garantiza resultados consistentes y fiables (Sommer et al., 2020). Los sistemas automatizados estandarizan el proceso, mantienen criterios uniformes para todas las muestras, minimizando el sesgo subjetivo y mejorando la reproducibilidad (Rodrigues et al., 2018).

El presente estudio represento las ventajas significativas de las curvas de calibración dosis-efecto automatizadas para rayos X empleando el ensayo CBMN, donde dicha integración de sistemas automatizados conllevo tanto la imagen de alta resolución, como las herramientas de análisis automatizado integradas en el software, logrado mejorar la exactitud, la reproducibilidad y la eficiencia en la estimación de dosis en biodosimetría en el país, de la mano con los trabajos previos desarrollados en este tema como lo fue Chaves et al., (2024), ya mencionado con otros biomarcadores. Los resultados obtenidos, confirman que los sistemas automatizados empleados ofrecen una amplia precisión y exactitud, a la vez que reducen la variabilidad inherente a la interpretación manual, donde los valores estadísticos de la curva dosis-respuesta presentados, validaron la fiabilidad de la automatización para la detección de MN, evidenciando una correlación lineal-cuadrática entre la frecuencia de micronúcleos y la dosis absorbida.

El primer hallazgo y más evidente del estudio, indico un claro incremento en la frecuencia de MN a medida que aumenta la dosis de rayos X en el rango de 0 a 4 Gy, este comportamiento dosis-respuesta, corresponde con lo esperado en ensayos citogenéticos, ya que como se menciona en estudios como los de Lusiyanti et al., (2016), en una gradiente de dosis, el daño inducido por RI en el ADN será directamente proporcional, provocando un aumento en la formación de fragmentaciones cromosómica y formación de MN (entre otros efectos biológicos) y es la principal característica para la construcción de las curvas dosis-efecto, y como se ha mencionado, a dosis cada vez más altas, se induce daño cromosómico con mayor frecuente, y con mayor grave en células individuales (Sommer et al., 2020).

Los datos recopilados para la construcción de la curva demostraron también otro hallazgo importante, respecto a la sobredispersión de estos mediante los valores estadísticos para la U de Papworth, ya que, algunos puntos presentaron desviaciones importantes respecto al valor teórico nulo, que se esperaría en condiciones de equidispersión; es decir, la variabilidad observada en los recuentos de MN (en exposiciones homogéneas), la cual, es significativamente mayor o inferior que la predicha por el modelo de Poisson, lo que sugiere la presencia de sobredispersiones (o en algunos casos subdispersión en puntos aislados) que podrían ser consecuencia de variabilidades biológicas intrínsecas, o de aspectos técnicos en el proceso de scoring (asignación de valores numéricos a atributos) (Antunes et al., 2014). La existencia de estos valores asociados al estadístico U, que en algunos casos exceden el umbral crítico (7.6 a 1 Gy o 3.44 a 3 Gy), es congruente con lo mencionado en investigaciones previas, donde se ha usado dicho estadístico para evidenciar distribuciones de MN que no se ajustan perfectamente al modelo de Poisson a exposiciones homogéneas de rayos X, como se comenta en Oliveira et al., (2015).

Así mismo, el número medio de MN por célula binucleada y la varianza, denotan una correlación directamente proporcional a el incremento de la dosis, donde, si la formación de MN siguiera estrictamente una distribución de Poisson, dicha varianza debería ser igual a la media, sin embargo, el comportamiento resulta en una varianza levemente mayor que la media a dosis elevadas, lo que enfatiza la presencia de sobredispersión, y respalda la necesidad de utilizar modelos estadísticos más flexibles como el negativo binomial, para describir adecuadamente estos datos (Boei et al., 2021; Lusiyanti et al 2016). La aplicación de los modelos NB, son pertinente cuando se detecta sobredispersiones en los recuentos de datos, ya que estos permiten incorporar un parámetro extra que ajusta la varianza de forma independiente de la media, ofreciendo así una mayor flexibilidad frente a alguna limitación observada en el modelos como el de Poisson, donde se ha demostrado en algunos estudios que la inclusión de parámetros de NB es fundamental para capturar de manera precisa la variabilidad biológica presente en ensayos de biodosimétricos (Higueras et al., 2015).

Ahora bien, según la estimación de dosis en las muestras incógnitas, utilizando recuentos aproximados de 200 y 1000 células, fueron para 1.5 Gy (dosimetría física), de 1.42 y 1.38 Gy, y para 3 Gy (dosimetría física), de 3.23 y 2.65 Gy respectivamente, dichas estimaciones, al mantener valores en el estadístico Z dentro del rango aceptable de $-3 < Z < 3$, en todos los casos, demostraron que las variaciones observadas están dentro de los límites estadísticamente aceptados y que el método de estimación utilizado es robusto para ensayos de biodosimetría como se valida en los manuales pertinentes de la IAEA, (2011) y norma ISO 13528:2022, no obstante, cabe resaltar que todos los valor se encuentra en el rango de $| Z | < 2$ considerado como satisfactorio. Si bien, autores como Antunes et al., (2014) y Rodrigues et al., (2016), han validado la precisión de la estimación de dosis mediante recuentos iguales o mayores a 1000 BN, destacando la disminución del

error estadístico y la mejora en la exactitud de la dosis estimada en sus casos particulares, la norma ISO 17099:2014 menciona o sugiere emplear ambos números de 200 y 1000 BN, ya que, estimaciones con recuentos con 200 BN mantienen un correcto triaje con una estimación de dosis adecuada, aspecto destacado en investigaciones como las de Vral et al., (2023) y el empleo de 1000 BN son suficientes para disminuir el error estadístico y mejora la exactitud. Los resultados obtenidos refuerzan la validación en la estabilidad de construcción de la curva, demostrando estimaciones fiables para su empleo en incidentes radiológicos.

En otro aspecto, los resultados de investigaciones presentados en el cuadro 4, sobre diversas curvas dosis-efecto en ensayos de MN, y diversos procesos de automatización, contrarrestadas con los resultados para esta investigación, permite profundizar sobre la variabilidad interlaboratorio y la estabilidad de las curvas de calibración (Sommer et al., 2020; Wills et al., 2021). La obtención de la ecuación del presente trabajo cuyos términos; independiente (C) 0.054458 ± 0.0052 , lineal (α) 0.044763 ± 0.0012 y cuadrático (β) 0.014543 ± 0.0003 , sugiere que el método ofrece una señal basal (valor en la frecuencia de MN cuando la dosis $D = 0$ Gy) relativamente alta, lo que podría indicar la presencia de un fondo de MN mayor (MN espontáneos en células no irradiadas) o una detección más sensible en la fase basal (capacidad del sistema para capturar variaciones muy pequeñas en la frecuencia de MN cercana a 0 Gy), lo que se puede atribuir a la configuración del sistema automatizado, calidad y la resolución de las imágenes fluorescentes, o criterios de clasificación programados, los cuales pueden ser menos restrictivos en la eliminación de falsos positivos que en otras investigaciones (Varga et al., (2004); IAEA, (2011), Zaguia et al., (2020)). Contrastado con los coeficientes de los cuatro estudios, los presentes para este trabajo, mostraron valores superiores en los tres términos (intercepto, lineal y cuadrático) lo que se puede deber primeramente a el tipo de estudio, dosis empleadas, fuente de radiación, y en la forma y criterios de

análisis automatizados, principalmente, al comparar dichos coeficientes con los presentes en los trabajos de Baeyens et al., (2011) y Lee et al., (2023) (en primer y segundo lugar), los cuales son los de mayor margen de comparación, ya que en dichas investigaciones, usaron sistemas similares de análisis automatizado Metafer4 y MNScore, dicho esto, las diferencias en la configuración del software y los criterios de selección de células, pueden tener gran responsabilidad en las diferencias, donde un mayor valor en el intercepto (0.054458 contra 0.0303 y 0.0178) del presente trabajo, sugiere niveles basales de MN elevados, pero también, una detección más sensible de pequeñas señales espontáneas del sistema automatizado empleado. Para el término lineal (0.0447 contra 0.0207 y 0.0237), la mayor tasa de inducción de MN por Gy, refleja una mayor sensibilidad inicial al daño cromosómico inducido por radiación. Y finalmente, el término cuadrático de 0.0145, se sitúa en un valor intermedio entre los presentados en Lee et al., (2023) de 0.0080, y, Baeyens et al., (2011) de 0.0280, indicando una respuesta moderada a la acumulación de daño a dosis crecientes respecto a los dos estudios, lo que puede ser reflejo de diferencias en el grado de saturación celular (límite de células capaces de dividirse y formar MN a dosis altas) o los efectos de segundo orden (probabilidad de daño por dos trayectorias de ionización) pertinentes de cada investigación, según las dosis empleadas y tipo de fuente de radiación (Varga et al., (2004); IAEA, (2011), Zaguia et al., (2020); Podevyn, (2021)). Estas comparaciones entre estudios son de importancia para una buena retroalimentación del trabajo, la integración de estos datos comparativos, no solo fortalece la evidencia en favor del uso del ensayo automatizado de micronúcleos en biodosimetría, sino que también posibilita la identificación de áreas de mejora para perfeccionar la estandarización y la repetibilidad de mediciones.

En conjunto, estos análisis y comparaciones demuestran que el análisis de imágenes automatizado mejora la estandarización y la reproducibilidad, reduciendo la

variabilidad entre analistas, además, la integración de algoritmos de aprendizaje automático, representa un enfoque promisorio para perfeccionar la precisión en la estimación de dosis. Estos hallazgos subrayan la necesidad de continuar avanzando en tecnologías de imagen, automatización y metodologías analíticas para optimizar la fiabilidad y eficiencia de la biodosimetría basada en CBMN y otros ensayos en biodosimétricos a nivel local y regional.

5. Conclusiones

- El procedimiento de irradiación de muestras de sangre periférica, denota ser robustos para la obtención de datos fiables y reproducibles. Los puntos de dosis seleccionados y cálculos de dosimetría física, permitieron garantizar distribuciones uniformes y exposiciones homogéneas, reflejadas en la correcta construcción de la curva dosis-efecto
- La implementación del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, se destacó como un procedimiento altamente fiable y versátil por el cual se logró evaluar más de 82 000 linfocitos binucleados irradiados con rayos X para este estudio, siendo una estrategia sólida y confiable para la generación de curvas de calibración
- La integración de la microscopía automatizada con modelos estadísticos avanzados, denoto ofrecer mejoras sustanciales en la estandarización y exactitud de la dosimetría biológica desarrollada en este trabajo, optimizando el proceso de puntuación, principalmente al aplicar criterios uniformes para la identificación de MN en grandes conjuntos de datos.
- El uso de automatización en ensayo de MN y demás ensayos en biodosimetría, se perfila de forma indispensable en la respuesta a emergencias radiológicas, no solo por su capacidad para reducir los tiempos y mejorar la precisión en las estimaciones de dosis, sino también por la

oportunidad de integración de métodos computacionales y de inteligencia artificial para una mayor capacidad de respuesta en regiones con recursos limitados, aumentando así la cobertura global de la dosimetría biológica en emergencias

- En este estudio logro denotar un incremento dosis-dependiente en la frecuencia de micronúcleos, acompañado de un aumento de la varianza y de la proporción de células con múltiples MN a dosis más altas.
- El análisis de las estadísticas de dispersión evidenció desviaciones significativas de los supuestos de Poisson, con sobredispersión y subdispersión, alternantes según los niveles de dosis. Estos hallazgos indican que la formación de MN no es puramente estocástica, reflejando probablemente la heterogeneidad biológica y la radiosensibilidad diferencial de las células, para abordar esta sobredispersión, se implementó un modelo binomial negativo tipo 1 (NB1), que proporcionó un ajuste superior al del modelo de Poisson, como lo demuestran la desviación residual menor, el AIC reducido y los valores mayores de log-verosimilitud. La suposición del modelo NB1, según la cual la varianza es linealmente proporcional a la media, concordó con los datos empíricos, y todos los parámetros estimados resultaron estadísticamente significativos.
- La curva dosis-respuesta resultante exhibió una clara relación lineal-cuadrática, lo que permitió estimar con precisión la dosis de dos muestras cegadas. Las dosis estimadas y sus intervalos de confianza correspondientes se alinearon estrechamente con las dosis realmente administradas, demostrando la fiabilidad del modelo. Todos los valores z permanecieron dentro del rango aceptable ($|Z| < 3$), según los criterios de aptitud para el propósito. Estos resultados subrayan el valor de integrar tecnologías de puntuación automatizada con modelos estadísticos robustos para mejorar la precisión y la reproducibilidad de la biodosimetría

citogenética, en particular en escenarios que exigen análisis de alto rendimiento y toma de decisiones rápidas, como emergencias radiológicas o evaluaciones de exposición a gran escala.

6. Recomendaciones

- Para futuras investigaciones en este ámbito es fundamental seguir ampliando el desarrollo de nuevos esquemas de automatización y una continua actualización de posibles alternativas en la parametrización de los criterios empleados por los softwares utilizados como lo fue el MNScoreX, buscando optimizar el conteo basal y la eliminación de artefactos, esto se podría realizar mediante ensayos puntuales que busquen afinar los umbrales de tamaño e intensidad de los micronúcleos.
- Una posible búsqueda de mejoras en las estimaciones de dosis se puede dar al realizar un ensayo estadístico para seleccionar los recuentos necesarios en BNC para un mejor triaje, manteniendo una correcta estimación dentro de los valores aceptables Z, realizando más estimaciones en diferentes rangos de recuentos celulares, al comparar recuentos de 200 y 1 000 BNC, con recuentos intermedios de 500 a 2 000 BNC, incorporando análisis de error estándar en cada recuento.
- Realizar una evaluación para buscar posibles causas de sobredispersión en el estudio podría favorecer futuras investigaciones, así como, el manejo de nuevos métodos de análisis en torno a este comportamiento en programas como R, empleado en este trabajo. Alguna alternativa para esto puede ser el analizar subgrupos celulares, agrupando por edad del donante o estatus inmunológico, para determinar si la contribución al estadístico U.
- La implementación de nuevas alternativas en modelos de automatización avanzados conjuntos o por separado a los ya empleado, como deep learning

o reinforcement learning pueden mejorar la segmentación y criterios de clasificación en análisis subsecuentes de MN para el laboratorio, además de realizar procesos de comparación puntuales para MN (ring trials) con otros centros que utilicen Metafer4/MNScoreX como próximas ampliaciones del trabajo, como se ha realizado anteriormente en otros biomarcadores

7. Fuente de financiamiento

Esta investigación fue posible gracias al apoyo financiero del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Costa Rica bajo el proyecto “Pry01-486-2021-Curvas dosis-efecto con rayos X utilizando el ensayo de cromosomas dicéntricos más anillos y el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis para el Servicio de Dosimetría Biológica del INISA” y el Organismo Internacional de Energía Atómica, esta última donando el equipo de microscopía automatizada Metasystems Metafer utilizado en este estudio.

8. Conflicto de intereses

Todos los investigadores mencionados en este trabajo, declaran no tener conflicto de intereses en ningún aspecto que llevo a la realización de esta investigación.

9. Referencias

- Agency, I. A. E. A. (2011). Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. En Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies (p. 1) [Text]. International Atomic Energy Agency.
<https://www.iaea.org/publications/8735/cytogenetic-dosimetry-applications-in-preparedness-for-and-response-to-radiation-emergencies>
- Antunes, A. C., Martins, V., Cardoso, J., Santos, L., & Monteiro Gil, O. (2014). The cytokinesis-blocked micronucleus assay: Dose estimation and inter-individual differences in the response to γ -radiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 760, 17-22.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.09.012>
- Aryankalayil, M., Bylicky, M. A., Chopra, S., Dalo, J., Scott, K., Ueda, Y., & Coleman, C. N. (2023). Biomarkers for Biodosimetry and Their Role in Predicting Radiation Injury. *Cytogenetic and Genome Research*, 163(3-4), 103-109. <https://doi.org/10.1159/000531444>
- Asano, N., Katsuma, Y., Tamura, H., Higashikuni, N., & Hayashi, M. (1998). An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: Computerized image analysis of acridine orange supravivally stained peripheral blood cells. *Mutation Research*, 404(1-2), 149-154.
[https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(98\)00108-0](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(98)00108-0)
- Baeyens, A., Swanson, R., Herd, O., Ainsbury, E., Mabhengu, T., Willem, P., Thierens, H., Slabbert, J. P., & Vral, A. (2011). A semi-automated micronucleus-centromere assay to assess low-dose radiation exposure in

human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 87(9), 923-931. <https://doi.org/10.3109/09553002.2011.577508>

Beinke, C., Port, M., & Abend, M. (2015). Automatic versus manual lymphocyte fixation: Impact on dose estimation using the cytokinesis-block micronucleus assay. *Radiation and Environmental Biophysics*, 54(1), 81-90.

<https://doi.org/10.1007/s00411-014-0575-0>

Balajee, A. S., Escalona, M., Iddins, C. J., Shuryak, I., Livingston, G. K., Hanlon, D., & Dainiak, N. (2019). Development of electronic training and telescoreing tools to increase the surge capacity of dicentric chromosome scorers for radiological/nuclear mass casualty incidents. *Applied radiation and isotopes : including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine*, 144, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2018.12.005>

Boei, J. J. W. A., Vermeulen, S., Skubakova, M. M., Meijers, M., Loenen, W. A. M., Wolterbeek, R., Mullenders, L. H. F., Vrieling, H., & Giphart-Gassler, M. (2012). No Threshold for the Induction of Chromosomal Damage at Clinically Relevant Low Doses of X Rays. *Radiation Research*, 177(5), 602. <https://doi.org/10.1667/RR2718.1>

Castro-Volio, I. (2013). Indicadores citogenéticos para la identificación de exposición a radiación ionizante en humanos. *Acta Médica Costarricense*, 55(3), 110-117. <https://doi.org/10.51481/amc.v55i3.797>

Chaves-Campos, F.-A., Ortíz-Morales, F., Mejías-Gamboa, R., González-Mesa, J. E., García-Lima, O., Rodríguez-Valerio, M. P., Vargas-Segura, W., & Cordero-Ramírez, A. (2024). Dose-effect calibration curve for high X-ray doses using the Calyculin-A chromosome premature condensation assay. *Brazilian Journal of Radiation Sciences*, 12(2), e2422. <https://doi.org/10.15392/2319-0612.2024.2422>

- Decordier, I., Papine, A., Plas, G., Roesems, S., Vande Loock, K., Moreno-Palomo, J., Cemeli, E., Anderson, D., Fucic, A., Marcos, R., Soussaline, F., & Kirsch-Volders, M. (2008). Automated image analysis of cytokinesis-blocked micronuclei: An adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring. *Mutagenesis*, 24(1), 85-93.
<https://doi.org/10.1093/mutage/gen057>
- Diaz, D., Scott, A., Carmichael, P., Shi, W., & Costales, C. (2007). Evaluation of an automated in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 630(1-2), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.02.006>
- Fenech, M. (2020). Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes*, 11(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/genes11101203>
- González Mesa, J. E., Alem Glison, D., Chaves-Campos, F. A., Ortiz Morales, F., Valle Bourrouet, L., Abarca Ramírez, M., Verdejo, V., Di Giorgio, M., Radl, A., Taja, M. R., Deminge, M., Rada-Tarifa, A., Lafuente-Alvarez, E., Lima, F. F. D., Hwang, S., Esposito Mendes, M., Mandina-Cardoso, T., Muñoz-Velastegui, G., Guerrero-Carbajal, Y. C., ... Martínez-López, W. (2024). LBDNet interlaboratory comparison for the dicentric chromosome assay by digitized image analysis applying weighted robust statistical methods. *International Journal of Radiation Biology*, 100(7), 1019-1028.
<https://doi.org/10.1080/09553002.2024.2356556>
- Higuera, M., Puig, P., Ainsbury, E. A., & Rothkamm, K. (2015). A new inverse regression model applied to radiation biodosimetry. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 471(2174), 20140588. <https://doi.org/10.1098/rspa.2014.0588>

- Huang, Z., Li, N., Rao, K., Liu, C., Huang, Y., Ma, M., & Wang, Z. (2018). Development of a data-processing method based on Bayesian k -means clustering to discriminate aneugens and clastogens in a high-content micronucleus assay. *Human & Experimental Toxicology*, 37(3), 285-294. <https://doi.org/10.1177/0960327117695635>
- International Atomic Energy Agency. (2000). Absorbed dose determination in external beam radiotherapy: An international code of practice for dosimetry based on standards of absorbed dose to water (IAEA Technical Reports Series No. 398). IAEA.
- International Atomic Energy Agency. (2011). Dosimetría citogenética: Aplicaciones en materia de preparación y respuesta a las emergencias radiológicas. Viena
- International Organization for Standardization. (2014). ISO 17099:2014 – Radiation protection — Performance criteria for laboratories using the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay in peripheral blood lymphocytes for biological dosimetry. Ginebra ISO.
- International Organization for Standardization. (2022). ISO 13528:2022: Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Ginebra: ISO.
- Lee, Y., Jin, Y. W., Seong, K. M., Wilkins, R. C., & Jang, S. (2023). Improving radiation dosimetry with an automated micronucleus scoring system: Correction of automated scoring errors. *Radiation and Environmental Biophysics*, 62(3), 349-356. <https://doi.org/10.1007/s00411-023-01030-7>
- Lusiyanti, Y., Alatas, Z., Syaifudin, M., & Purnami, S. (2016). Establishment of a Dose-response Curve for X-ray-Induced Micronuclei in Human

Lymphocytes. *Genome Integrity*, 7, 7. <https://doi.org/10.4103/2041-9414.197162>

Oliveira, M., Einbeck, J., Higuera, M., Ainsbury, E., Puig, P., & Rothkamm, K. (2015). Zero-inflated regression models for radiation-induced chromosome aberration data: A comparative study. *Biometrical Journal*, 58(2).

<https://doi.org/10.1002/bimj.201400233>

Podevyn, L. (2021). CYTOKINESIS-BLOCK MICRONUCLEUS ASSAY AS HIGH-THROUGHPUT BIODOSIMETRY METHOD FOR TRIAGE SCREENING IN CASE OF RADIOLOGICAL ACCIDENTS (Doctoral dissertation, Ghent University).

Repin, M., Garty, G., Garippa, R. J., & Brenner, D. J. (2024). RABiT-III: An Automated Micronucleus Assay at a Non-Specialized Biodosimetry Facility. *Radiation Research*, 201(6), 567-571. <https://doi.org/10.1667/RADE-23-00120.1>

Repin, M., Pampou, S., Garty, G., & Brenner, D. J. (2019). RABiT-II: A Fully-Automated Micronucleus Assay System with Shortened Time to Result. *Radiation Research*, 191(3), 232. <https://doi.org/10.1667/RR15215.1>

Rodrigues, M. A., Beaton-Green, L. A., & Wilkins, R. C. (2016). Validation of the Cytokinesis-block Micronucleus Assay Using Imaging Flow Cytometry for High Throughput Radiation Biodosimetry. *Health Physics*, 110(1), 29. <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000000371>

Rodrigues, M. A., Beaton-Green, L. A., Wilkins, R. C., & Fenech, M. F. (2018). The potential for complete automated scoring of the cytokinesis block micronucleus cytome assay using imaging flow cytometry. *Mutation*

Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 836, 53-64.

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.05.003>

Romero, I., Mandina Cardoso ,Tania, Cabitto ,Mariana, Deminge ,Mayra, Rearte ,Julieta Fernandez, Vaquero ,Hernan, Farias de Lima ,Fabiana, Esposito Mendes ,Mariana, Melo Silva ,Laís, Lafuente-Álvarez ,Erika Flavia, Rada-Tarifa ,Ana, Verdejo ,Valentina, Radl ,Analia, Saavedra ,Nicolás, Santibañez ,Mauricio, Brenes Obando ,Nelson, Chaves-Campos ,Fabio Andrés, Ortíz ,Fernando, Valle ,Luisa, ... and García Lima, O. (2025). LBDNet inter-laboratory comparison at high doses of ionizing radiation using the dicentric plus caffeine assay. *International Journal of Radiation Biology*, 101(6), 636-651. <https://doi.org/10.1080/09553002.2025.2494554>

Schreiber, G. A., Beisker, W., Braselmann, H., Bauchinger, M., Bögl, K. W., & Nüsse, M. (1992). An Automated Flow Cytometric Micronucleus Assay for Human Lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 62(6), 695-709. <https://doi.org/10.1080/09553009214552651>

Schunck, C., Lörch, T., Kowalski, R., Porter, M., Mahnke, R., Capaccio, C., Perrier, J., & Damer, K. (2023). A standardized and automated CBMN assay for biological dosimetry: The CytoRADx™ system. *Radiation Protection Dosimetry*, 199(14), 1516-1519. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncad027>

Shibai-Ogata, A., Tahara, H., Yamamoto, Y., Fujita, M., Satoh, H., Yuasa, A., Hioki, T., & Kasahara, T. (2014). An automated new technique for scoring the in vivo micronucleus assay with image analysis. *Mutagenesis*, 29(1), 63-71. <https://doi.org/10.1093/mutage/get064>

Shuryak, I., Royba, E., Repin, M., Turner, H. C., Garty, G., Deoli, N., & Brenner, D. J. (2022). A machine learning method for improving the accuracy of radiation biodosimetry by combining data from the dicentric chromosomes

and micronucleus assays. *Scientific Reports*, 12(1), 21077.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-25453-2>

Sommer, S., Buraczewska, I., & Kruszewski, M. (2020). Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>

Stich, H. F., Acton, A. B., & Palcic, B. (1990). Towards an Automated Micronucleus Assay as an Internal Dosimeter for Carcinogen-Exposed Human Population Groups. En P. Band (Ed.), *Occupational Cancer Epidemiology* (Vol. 120, pp. 94-105). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-84068-5_7

Thierens, H., & Vral, A. (2009). The micronucleus assay in radiation accidents. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 45(3), 260-264.

Tucker, J. D., Vadapalli, M., Joiner, M. C., Ceppi, M., Fenech, M., & Bonassi, S. (2013). Estimating the Lowest Detectable Dose of Ionizing Radiation by the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay. *Radiation Research*, 180(3), 284-291. <https://doi.org/10.1667/RR3346.1>

Valle Bourrouet, L., Ortiz Morales, F., García Lima, O., González Mesa, J. E., Chaves Campos, A., Rodríguez González, M., & Abarca Ramírez, M. (2022). Inicio de la Dosimetría Biológica en Costa Rica y su importancia en la atención de poblaciones sobreexpuestas a radiaciones ionizantes. *Población y Salud en Mesoamérica*.
<https://doi.org/10.15517/psm.v19i2.49210>

- Varga, D. (2004). An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis. *Mutagenesis*, 19(5), 391-397.
<https://doi.org/10.1093/mutage/geh047>
- Vral, A., Fenech, M., & Thierens, H. (2011). The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*, 26(1), 11-17. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq078>
- Vral, A., Endesfelder, D., Balázs, K., Beinke, C., Petrenci, C. C., Finot, F., Garty, G., Hadjiiska, L., Hristova, R., Ivanova, I., Lee, Y., Lumniczky, K., Milanova, M., Gil, O. M., Oestreicher, U., Pajic, J., Patrono, C., Pham, N. D., Perletti, G., ... Baeyens, A. (2023). RENEB Inter-Laboratory Comparison 2021: The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay. *Radiation Research*, 199(6), 571-582. <https://doi.org/10.1667/RADE-22-00201.1>
- Willems, P., August, L., Slabbert, J., Romm, H., Oestreicher, U., Thierens, H., & Vral, A. (2010). Automated micronucleus (MN) scoring for population triage in case of large scale radiation events. *International Journal of Radiation Biology*, 86(1), 2-11. <https://doi.org/10.3109/09553000903264481>
- Wills, J. W., Verma, J. R., Rees, B. J., Harte, D. S. G., Haxhiraj, Q., Barnes, C. M., Barnes, R., Rodrigues, M. A., Doan, M., Filby, A., Hewitt, R. E., Thornton, C. A., Cronin, J. G., Kenny, J. D., Buckley, R., Lynch, A. M., Carpenter, A. E., Summers, H. D., Johnson, G. E., & Rees, P. (2021). Inter-laboratory automation of the in vitro micronucleus assay using imaging flow cytometry and deep learning. *Archives of Toxicology*, 95(9), 3101-3115.
<https://doi.org/10.1007/s00204-021-03113-0>
- Yoda, H., Abe, K., Takeo, H., Takamura-Enya, T., & Koike-Takeshita, A. (2024). Application of image-recognition techniques to automated micronucleus

detection in the in vitro micronucleus assay. *Genes and Environment*, 46(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s41021-024-00305-9>

Zaguia, N., Laplagne, E., Colicchio, B., Cariou, O., Al Jawhari, M., Heidingsfelder, L., Hempel, W. M., Jrad, B. B. H., Jeandidier, E., Dieterlen, A., Carde, P., Voisin, P., & M'kacher, R. (2020). A new tool for genotoxic risk assessment: Reevaluation of the cytokinesis-block micronucleus assay using semi-automated scoring following telomere and centromere staining. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 850-851, 503143. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503143>