

10H-FC
1AG-F
1534
1

Estudio de Sobrevivencia de Embriones de Peces Cebra (Zebrafish) Sometidos a Radiación Ionizante

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magíster en Ciencias con Mención en Física
Facultad de Ciencias

por



Pamela Alejandra Mena Romano

Octubre, 2010

Directores de Tesis: **Dr. José Roberto Morales**
Dr. Miguel Allende

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

Pamela Alejandra Mena Romano

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención en Física, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de Octubre de 2010.

Directores de Tesis

Dr. José Roberto Morales

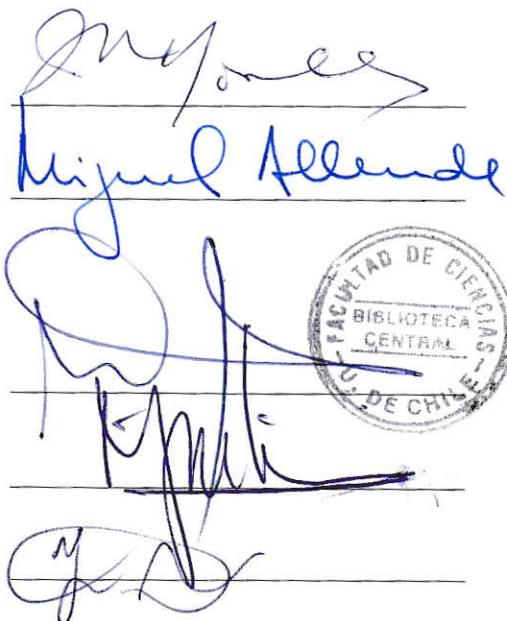
Dr Miguel Allende

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Mauricio Canals (Presidente)

Dr. Mario Ávila

Jaime Rössler



The image shows four handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal line. The signatures are: 1. José Roberto Morales, 2. Miguel Allende, 3. Mauricio Canals, and 4. Jaime Rössler. To the right of the signatures is a circular stamp with the text 'FACULTAD DE CIENCIAS', 'BIBLIOTECA CENTRAL', and 'UNIVERSIDAD DE CHILE'.



*Dedico este trabajo a mi madre,
quien ha sido un pilar fundamental en mi vida.*



AGRADECIMIENTOS

En este largo camino recorrido he tenido a mi lado a muchas personas que de alguna u otra forma ayudaron a que fuese posible concluir este proceso de la mejor manera posible y es a ellos a quienes dirijo estas palabras.

Primeramente quiero mencionar mi madre, Hilda Romano. Le estaré eternamente agradecida por su apoyo incondicional, su preocupación e interés en mis ideas y proyectos, sus palabras de aliento y por estar siempre ahí cuando la he necesitado.

Quiero agradecer a mi padre, Tomás Mena, por los sacrificios que hizo en pro de que pudiera conseguir mis sueños; a mis hermanos, Tomás y Vanessa, porque me han enseñado que la perseverancia es fundamental para lograr lo que cada uno se propone.

Agradezco a mi tutor, Roberto Morales, por las enseñanzas que me entregó durante este período.

Por otra parte, el presente trabajo no hubiese sido posible sin la amable y desinteresada ayuda de,

Beatriz Alfaro de la Fundación Arturo López Pérez, quien con mucha gentileza, nos permitió usar el equipo para irradiar.

Jorge Gamarra de la Comisión Chilena de Energía Nuclear, quien nos facilitó el uso de sus equipos para las lecturas de los dosímetros TLD.

Adicionalmente, quiero hacer una mención especial a Miguel Allende y todas las personas del laboratorio "Zebrafish For Innovation and Research", por el recibimiento en vuestro lugar de trabajo; me sentí sumamente acogida y como una compañera más. Gracias por la disposición de todos y cada uno de ustedes para ayudarme en lo que necesitara y enseñarme todo lo que sé respecto a biología del desarrollo y



pez cebra. Pude hacer amigos muy especiales en mi estadía en el “lab”, Camila Mardones, Rosario Villegas, Javiera de la Paz, Leonardo Valdivia y María del Sol, muchas gracias por todo el apoyo y cariño.

En mi desarrollo como investigadora, he tenido varios profesores, a quienes les agradezco, sus enseñanzas, ideas, consejos, amistad, incluso retos por parte de algunos, que me hicieron crecer mucho como científico. Ellos son, Rodrigo Ferrer, Orfa Reyes, José Rogan y Hugo Arellano. Conjuntamente a Vicky Alcaíno, secretaria del Departamento de Física, le agradezco que siempre estuvo dispuesta a ayudarme en lo que necesitara.

En el transcurso como alumna de pregrado, hice grandes amigos. Felipe Asenjo, Claudia Loyola, Carla Frigerio, Romina Menares, Gabriela Román, Cristián Ortiz, muchas gracias por su apoyo y amistad.

A mis amigos de la vida, Mariela Silva y Enrique Fischer, muchas gracias por todo.

Finalmente quiero dar las gracias, porque el aprendizaje más importante que tuve en este proceso fue que, por muy difícil que parezca, cuando uno realmente quiere lograr algo, se puede.



Índice

1. Introducción	1
1.1. Objetivos	2
1.1.1. Objetivo General	2
1.1.2. Objetivos Específicos	2
2. Física de Radiación	4
2.1. Interacción de la Radiación Electromagnética con la Materia	4
2.1.1. Efecto Fotoeléctrico.	6
2.1.2. Dispersión de Compton	7
2.1.3. Formación de Pares	7
2.2. Dosimetría de Radiación	8
2.2.1. Magnitudes Dosimétricas	8
2.2.2. Termoluminiscencia	12
2.3. Radiobiología	13
2.3.1. Efectos de la Radiación Ionizante	13
3. Pez Cebra	17
3.1. Modelo para Estudio de Enfermedades.	17
3.2. Desarrollo de Embrión	19



4. Materiales y Métodos	21
4.1. Procedimiento para Irradiación	21
4.1.1. Irradiación de TLD	21
4.1.2. Características de Irradiador	24
4.1.3. Irradiación de embriones	25
4.2. Cuidado y Manejo de Peces	28
4.2.1. Obtención de Embriones	28
4.3. Procedimiento Posterior a Irradiación	29
5. Resultados y Análisis	31
5.1. Homogeneidad en Lectura de Dosímetros	31
5.2. Calibración Dosímetros Termoluminiscentes (TLD)	32
5.3. Dosis entregada por TLD	33
5.4. Distribución de Radiación en Campo	35
5.5. Sobrevivencia de embriones	36
5.6. Efectos Subletales	43
5.6.1. Efectos Morfológicos	43
5.6.2. Muerte Celular	45
6. Conclusiones	52



Índice de figuras

2.1. Efecto Fotoeléctrico.	7
2.2. Dispersión de Compton.	8
2.3. Formación de Pares.	8
2.4. Esquema de transferencia de energía de un fotón ($h\nu$) al medio. . . .	10
2.5. Nivel energético en proceso de termoluminiscencia, con modelo de bandas.	13
3.1. Desarrollo del embrión de pez cebra en las primeras 48 horas	20
4.1. Disposición de dosímetros para estudio de homogeneidad.	22
4.2. Bandeja de Lectura TLD.	22
4.3. Distribución de cristales dentro del campo de radiación.	23
4.4. Esquema de decaimiento ^{60}Co	25
4.5. Cabezal de una máquina de ^{60}Co	26
4.6. Montaje del blindaje de cobre en el campo de radiación	27
5.1. Gráfico de la lectura de los dosímetros irradiados a 1 [mSv].	32
5.2. Gráfico que muestra la relación entre la dosis administrada y la lectura dosimétrica.	34
5.3. Gráfico de la distribución de la radiación en el campo irradiado. . . .	37
5.4. Supervivencia de los embriones para el primer experimento.	38



5.5. Supervivencia de los embriones para el segundo experimento. 39

5.6. Supervivencia de los embriones en función del tiempo, con método de Kaplan-Meier. 40

5.7. Supervivencia de los embriones en función de la dosis. 41

5.8. Logaritmo de supervivencia de los embriones en función de la dosis. . . 42

5.9. Ajuste de datos con método de Probit, para determinar LC_{50} 43

5.10. Morfología de embriones irradiados. 44

5.11. Muerte celular de embriones irradiados. 47

5.12. Comparación de muerte celular de embriones irradiados a 2 [Gy]. . . 49

5.13. Comparación de muerte celular de embriones irradiados a 4 [Gy]. . . 50

5.14. Comparación de muerte celular de embriones irradiados a 8 [Gy]. . . 51



Índice de tablas

5.1. Datos de Carga entregados para estudio de homogeneidad de lectura de dosímetros	31
5.2. Correlación entre Dosis y Carga	33
5.3. Datos de Carga entregados para segundo experimento de control de dosis con TLD.	34
5.4. Datos de Carga entregados para tercer experimento de control de dosis con TLD.	35
5.5. Datos de Carga entregados para estudio de distribución de dosis en campo	36
5.6. Supervivencia de embriones irradiados, primera experiencia.	38
5.7. Supervivencia de embriones irradiados, segunda experiencia.	39
5.8. Cálculo de probito	41
5.9. Datos de Carga entregados para experimento de irradiación con blindaje de cobre.	46
5.10. Porcentaje de atenuación de blindaje de cobre.	46

RESUMEN

El pez cebra en estos últimos años se ha convertido en un modelo biológico ideal para estudiar enfermedades humanas de diferentes tipos, siendo particularmente útil en los estudios de efectos de radiación ionizante.

En el presente estudio, se determinó la dosis de radiación capaz de provocar un 100 % de muerte en embriones del pez cebra, de 3 horas postfertilización (hpf), siendo éste valor entre 12 y 16 [Gy].

Adicionalmente, se realizó un experimento para estudiar la muerte celular de los embriones y la efectividad de un blindaje de cobre, en términos de protección de efectos nocivos. Los resultados mostraron una clara protección a nivel morfológico, especialmente en dosis altas, y además, que los embriones protegidos presentaban una disminución en la cantidad de células muertas en comparación con los no protegidos.

La tasa de atenuación de dicho blindaje de cobre, se obtuvo a través del uso de dosímetros termoluminiscentes (TLD), que mostraron que el blindaje atenuó un 55,8 %.

Por otra parte, se hizo necesario realizar un estudio de la homogeneidad en la lectura de los TLD, para poder considerar el resultado anterior válido. Este estudio mostró que, para estos cristales el coeficiente de variación es de un 10,8 %.

Finalmente, se estudió el comportamiento de la radiación dentro del campo, obteniéndose una diferencia de dosis entre el extremo y el centro del campo del orden de 30 %, por lo que en todas las experiencias se aseguró que los embriones se encontraran cercanos al centro del campo.

ABSTRACT

Zebrafish in recent years, has become a favored biological model to study human diseases of different types, being specially useful in research of ionizing radiation effects.

In the present work, the radiation dose that can produce death in 100% of zebrafish embryos of 3 hours postfertilization (hpf), was determined, which turned out to be between 12 and 16 [Gy].

Besides, a study of cell death and effectiveness of a copper shield (in terms of harmful effects protection), was developed. The results showed a clear morphological effects protection, specially in high doses, and also, that those embryos protected had a lower number of dead cells than those exposed directly to the radiation source.

The attenuation percentage of this copper shield, was 55,8%, which was measured with the utilization of thermoluminescent dosimeters (TLD).

In order to consider the previous result reliable, a study of TLD reading homogeneity became necessary, showing for these crystals, a variation coefficient of 10,8%.

Finally the radiation distribution on the field was determined, with a dose difference between the periphery and center of the field, of 30%.

Capítulo 1

Introducción

Los efectos de la radiación sobre los seres vivos han sido estudiados de diversas formas, tanto indirectas como directas. Dada la dificultad de contar con modelos adecuados para estudiar los efectos de la radiación ionizante *in vivo*, ya sea por costo o consideraciones éticas, han surgido modelos aceptables para estos estudios que incluyen animales invertebrados y, más recientemente, los embriones y larvas del pez cebra.

Se han realizado estudios en los que se inducen mutaciones a través de la irradiación de embriones heterocigotos¹ con fotones, los que proporcionalmente a la dosis, al cruzarse con individuos homocigotos², producían peces homocigotos, traducándose esto en un pez mutado, el que era fácilmente observado, puesto que dicha mutación era la falta de pigmentación (albinismo) [2], [3].

Por otra parte se han utilizado embriones de peces cebra para estudiar modificadores de radiación, a través de la comparación de los efectos producidos a embriones tratados con un radioprotector (amifostina) con los que no lo fueron, llegándose a la conclusión que la amifostina atenuaba notoriamente la perturbación producida

¹Individuos que presentan dos alelos (cada una de las formas alternativas que tiene un gen) distintos para un mismo gen

²Individuos que presentan los mismos alelos para un gen

al desarrollo normal del embrión. De la misma manera se hizo la comparación entre peces tratados con un agente radiosensibilizador (AG1478) obteniéndose como resultado que este agente incrementaba la teratogénesis³ y letalidad [4].

A raíz de lo anterior, es de suma importancia, conocer en máximo detalle, la respuesta del embrión a la radiación según el estadio en el que es irradiado y la dosis que se le administró.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

El objetivo general de este proyecto es en primer lugar implementar la metodología idónea para el estudio de los efectos de la radiación en el embrión de pez cebra y a partir de allí, obtener de forma experimental la tasa de sobrevivencia de embriones de peces cebra (zebrafish) sometidos a radiación ionizante, que proviene de una fuente de ^{60}Co ; además de hacer un análisis de los efectos biológicos producidos por la radiación a dosis subletal.

1.1.2. Objetivos Específicos

Los embriones del pez cebra responden de formas distintas a la radiación según la etapa de su desarrollo en la que se encuentren, y como ésta cambia rápidamente, se necesita en primer lugar obtener la dosis específica que provocará letalidad en los embriones del estadio particular a estudiar. Una vez obtenida esta curva, se puede proceder a irradiar los embriones con dosis inferiores a la que produce un 100% de mortalidad, para hacer un estudio tanto de los efectos fenotípicos (aquellos efectos que producen un cambio en la morfología del embrión) como de los efectos a nivel

³Término que se refiere a malformaciones anatómicas.

celular, específicamente la muerte de éstas.

Por otra parte, se sabe que las dosis obtenidas en un blanco dependen de diferentes factores, uno de ellos, es la atenuación de la radiación electromagnética, que depende tanto del espesor del material con el que interactúa como de la energía de los fotones que inciden sobre éste. Por esta razón, el hecho de utilizar un blindaje entre la fuente y la muestra, implica que las consecuencias biológicas no serán las mismas, debido a las diferentes intensidades de los fotones que en definitiva llegarán a los embriones. De esta manera se puede hacer una comparación entre los efectos biológicos de la muestra de embriones sometida a radiación atenuada por un bloque de cobre, con los efectos de la muestra no atenuada.

Finalmente se controlará la dosis recibida tanto por los embriones protegidos, como los no protegidos, con la utilización de dosímetros TLD (thermoluminiscent dosimeter).

Capítulo 2

Física de Radiación

2.1. Interacción de la Radiación Electromagnética con la Materia

La radiación electromagnética interactúa con la materia de una forma distinta al caso de las partículas cargadas, porque mientras las partículas pueden perder parte de su energía al interactuar con ésta, la radiación electromagnética se atenúa al pasar a través de un material, disminuyendo su intensidad pero no su energía.

Este paso de radiación a través de la materia se caracteriza por una ley de absorción exponencial,

$$I(x) = I_0 e^{-\mu x} \quad (2.1)$$

la cual da la intensidad (es decir, el número de fotones por centímetro cuadrado por segundo) de un haz electromagnético de intensidad original I_0 luego de atravesar un material homogéneo de grosor x , cuyo coeficiente de atenuación es μ para radiación electromagnética de la energía en consideración. Es importante notar que esta ley es válida cuando el haz es monoenergético, está colimado (es decir la trayectoria de los fotones es la misma) y el material con el que interactúa es delgado (esta

condición es importante para poder desprestigiar múltiples interacciones de un fotón con el material) [5], [6].

Los procesos que originan la atenuación de la radiación son de dos tipos, a) la absorción, en la cual parte o la totalidad de la energía de los fotones es traspasada a electrones como energía cinética, y b) la difusión, en la cual un fotón es desviado del haz.

Los fotones difundidos del haz no se consideran en términos de traspaso de energía, por lo que hay que hacer una distinción entre ambos procesos:

$$\mu = \mu_a + \mu_s$$

El coeficiente μ_a representa la energía depositada en el medio, la cual es interesante conocer desde el punto de vista radiobiológico [7]. Los coeficientes de atenuación dependen del número atómico del material absorbente y de la energía de los fotones incidentes de una manera que queda determinada por los diferentes procesos de interacción:

1. Difusión elástica (Rayleigh, Thomson y resonancia nuclear)
2. Efecto Fotoeléctrico
3. Dispersión Compton
4. Producción de Pares.

Cada uno de estos procesos tiene asociado una cierta probabilidad de ocurrencia, que se denomina sección eficaz. Por tanto si se asignan distintas secciones eficaces para cada proceso, σ_R , σ_F , σ_C y σ_P , a los procesos individuales de difusión de Rayleigh,

efecto fotoeléctrico, dispersión de Compton y producción de pares respectivamente, el coeficiente de atenuación lineal se puede escribir como:

$$\mu = N(\sigma_R + \sigma_F + \sigma_P + Z\sigma_C)$$

donde N es el número de átomos del material por m^3 . El hecho que la sección eficaz de Compton esté multiplicada por el número atómico, es debido a que este efecto tiene lugar sobre los electrones individuales y no sobre el átomo como un todo. En general se consideran sólo los últimos tres procesos mencionados anteriormente, por ser los de mayor probabilidad de ocurrencia y se explican a continuación:

2.1.1. Efecto Fotoeléctrico.

La energía de fotones incidentes puede ser absorbida completamente por electrones en los átomos, particularmente por aquéllos de las órbitas internas (la conservación de momentum no permite la absorción por parte de electrones no ligados). La probabilidad de esta absorción va aumentando mientras más ligado está el electrón, siendo el 80 % de la absorción fotoeléctrica realizada por electrones de la capa K, si el fotón tiene la energía suficiente para provocar una emisión de dicho electrón del átomo. El electrón emitido saldrá con una energía cinética:

$$T = h\nu - E_k$$

donde E_k representa la energía de ionización del electrón de la capa K (Fig. 2.1). El átomo residual como un todo, se lleva la energía de retroceso, de tal manera que el momentum y el balance de energía es preservado [5], [7], [8].

Este proceso es particularmente importante en elementos de alto número atómico (Z), y deja de ser significativo para energías superiores a 1[MeV].

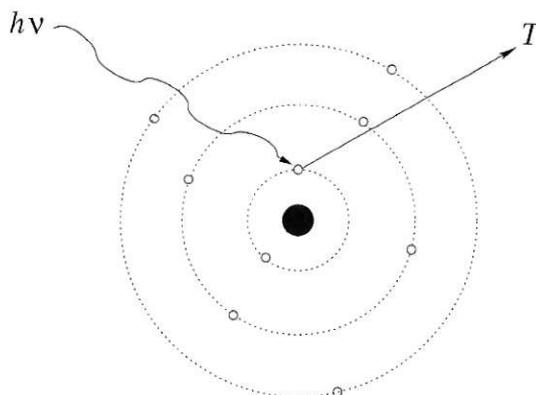


Figura 2.1: Efecto Fotoeléctrico.

2.1.2. Dispersión de Compton

Este proceso constituye el mecanismo de absorción de energía para la radiación cuya energía es del orden de 0,5 a 10 [MeV]. La dispersión de Compton se puede pensar como equivalente al Efecto Fotoeléctrico para un electrón atómico cuasi-libre. Suponiendo que el fotón tiene energía $h\nu$ y momentum $\frac{h\nu}{c}$, y usando netamente expresiones de energía-momentum relativistas, se puede demostrar que la energía del fotón dispersado en relación con el incidente, viene dada por:

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \frac{h\nu}{mc^2}(1 - \cos\theta)}$$

donde m es la masa en reposo del electrón y θ el ángulo entre la dirección del fotón dispersado e incidente. Es importante notar que la energía de éste será siempre menor que la del fotón incidente, lo que se traduce en un traspaso de la energía del fotón al electrón. La Fig. 2.2 muestra un diagrama de la Dispersión Compton.

2.1.3. Formación de Pares

Si la energía de la radiación incidente supera los 1,02 [MeV], la producción de un par electrón-positrón es energéticamente posible (Fig. 2.3), pero sólo en la vecindad

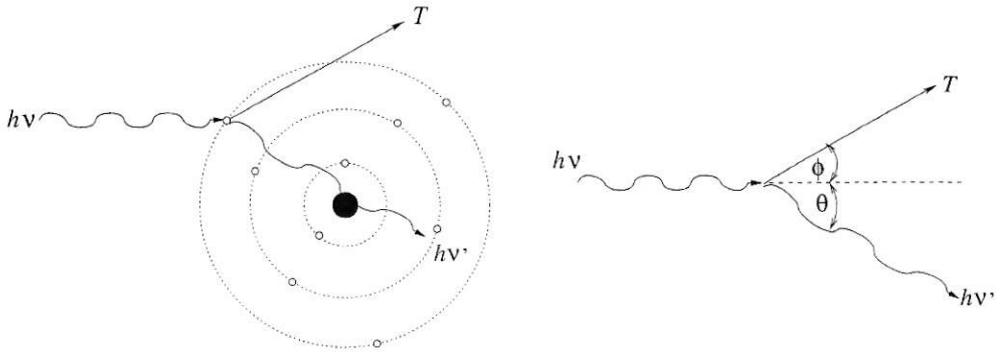


Figura 2.2: Dispersión de Compton.

de un compañero de colisión, quien se encarga de llevarse la cantidad adecuada de momentum con el fin de preservar la conservación de éste. Dicho compañero de colisión puede ser tanto el núcleo como un todo, o un electrón atómico [5].

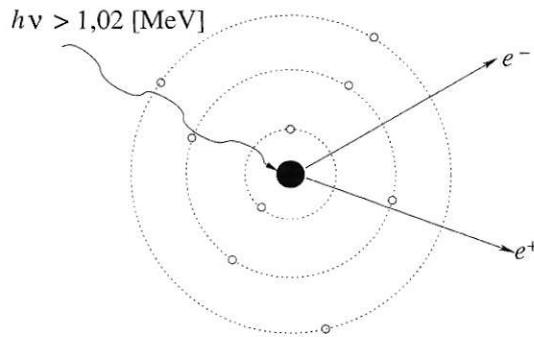


Figura 2.3: Formación de Pares.

2.2. Dosimetría de Radiación

2.2.1. Magnitudes Dosimétricas

La dosimetría es esencial para cuantificar la incidencia de varios cambios biológicos como función de la cantidad de radiación recibida, para comparar diferentes experimentos, para monitorear la exposición de individuos a la radiación y la vigilancia del medioambiente [9].

La transferencia de energía desde un haz de fotones al medio toma lugar en dos pasos. El primer paso (resultando en *Kerma*) involucra la interacción del fotón con el átomo, causando que el electrón o electrones se liberen. El segundo paso (resultando en *Dosis absorbida*) involucra la transferencia de energía desde el electrón movilizadado en la primera parte, al medio a través de ionización y excitación [10].

KERMA (Kinetic Energy Released in the Medium)

Esta cantidad no estocástica es relevante sólo para campos de radiación indirectamente ionizante y fue introducida por la International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU) [11] para describir la interacción del fotón con el átomo [10].

Se define como:

$$K = \frac{d\bar{E}_{tr}}{dm}$$

donde $d\bar{E}_{tr}$ es la energía cinética transferida desde fotones a electrones en un elemento de volumen de masa dm .

Dosis Absorbida

La dosis absorbida es relevante para todo tipo de campos de radiación ionizante, ya sea directa o indirecta. La diferencia entre Kerma y dosis absorbida puede observarse en Fig 2.4. La energía es transferida al electrón en (a), pero no toda es retenida en el medio, algo de ella es irradiada por bremsstrahlung. La dosis absorbida es la energía retenida en el medio, la cual es depositada a través de las ionizaciones y excitaciones que ocurren a lo largo del camino recorrido por las partículas movilizadas en el primer paso de transferencia de energía (b) [10].

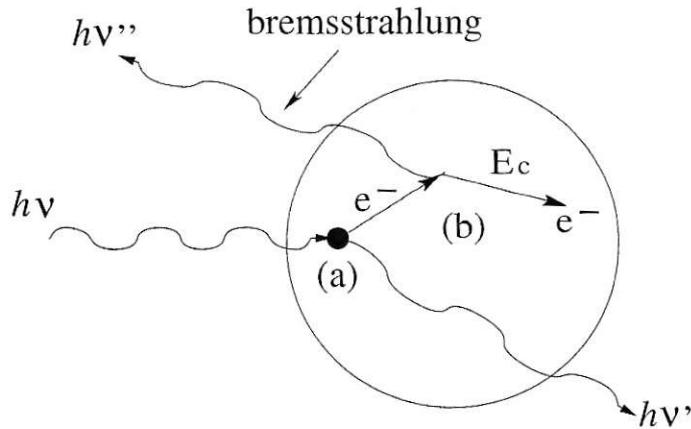


Figura 2.4: Esquema de transferencia de energía de un fotón ($h\nu$) al medio. El fotón interactúa con el electrón en (a) entregándole energía cinética E_c y produciéndose un nuevo fotón deflexado ($h\nu'$). Este electrón va depositando su energía a lo largo de (b) principalmente por colisiones. La transferencia de energía en (a) es denominada Kerma, y en (b), dosis absorbida.

La dosis absorbida D se define en función de una cantidad estocástica, denominada *energía impartida* $\bar{\epsilon}$ [11]:

$$D = \frac{d\bar{\epsilon}}{dm}$$

La energía impartida $\bar{\epsilon}$ es la suma de toda la energía que entra al volumen de interés menos toda la energía que sale del volumen, considerando toda conversión dentro del volumen. La producción de pares, por ejemplo, disminuye la energía en 1,022 [MeV], mientras la aniquilación electrón-positrón incrementa la energía en la misma cantidad [12].

Las dimensiones de dosis absorbida y Kerma son las mismas, pero en el caso de la dosis absorbida se utiliza la unidad *Gray* (Gy) que corresponde en el sistema internacional a:

$$1[\text{Gy}] = 1 \left[\frac{\text{J}}{\text{kg}} \right]$$

Dosis Equivalente

Para propósitos de física de la salud, la especificación de la dosis absorbida es inadecuada para tener una evaluación completa y precisa del posible daño provocado por la radiación. Aunque el riesgo de un potencial daño se incrementa con el aumento de la dosis absorbida, es necesario tener en cuenta algunos factores de ponderación.

Tal es el caso del factor de calidad Q , el cual corresponde a una variable adimensional que se aplica a la dosis absorbida con el fin de proveer una estimación del daño relativo provocado por diferentes tipos y energías de radiación [13]. Los valores de Q son seleccionados de valores experimentales de la *efectividad biológica relativa* (RBE) que es la razón entre la dosis por fotones X o γ y la dosis por otro tipo de radiación, que provoca el mismo tipo y grado de efecto biológico. En el caso de la radiación X y γ , el valor del factor es por supuesto $Q = 1$.

La dosis equivalente H , se define como:

$$H \equiv DQ$$

donde D es la dosis absorbida y Q el factor de calidad anteriormente mencionado [14]. Si la dosis absorbida está dada en $[\text{J}/\text{kg}]$, entonces H también lo estará, ya que Q es adimensional, pero para diferenciar una dosis de otra, la unidad de la dosis equivalente es *Sievert* (Sv).

2.2.2. Termoluminiscencia

Termoluminiscencia, es un efecto que consiste en la emisión de luz, por un aislante o semiconductor que puede ser observada cuando el sólido es estimulado térmicamente. Para que el sólido emita luz, es necesario que previamente haya absorbido energía proveniente de radiación ionizante.

Se puede inducir la emisión de luz en algún laboratorio, luego de que el cristal haya absorbido la radiación; para obtener una proporción entre la luz emitida en el laboratorio y los fotones absorbidos previamente por el cristal. Esto se realiza, con el fin de utilizar el cristal como dosímetro (por ejemplo, en el caso de dosimetría personal) [15], [16].

Un modelo fenomenológico útil que explica el mecanismo de la termoluminiscencia es el modelo de bandas para sólidos. Las trampas y centros de recombinación de electrones, dados por las impurezas del cristal, están localizados en la brecha de energía entre las bandas de valencia y la de conducción. Los estados permitidos justo por debajo de la banda de conducción representan las trampas electrónicas y los estados justo superiores a la banda de valencia son las trampas de los huecos. Los niveles posibles de atrapamiento están vacíos antes de la irradiación (las trampas de huecos contienen electrones y las trampas electrónicas están vacías). Durante la irradiación, los electrones pueden pasar a la banda de conducción, dejando un hueco en la banda de valencia, ver Fig. 2.5 [15]. Luego el sistema puede volver al equilibrio a través de varios métodos, donde el que nos interesa es el caso en que las cargas quedan atrapadas en la trampa electrónica, y por tanto para que el electrón pueda volver a la banda de valencia, el cristal debe ser estimulado térmicamente (termoluminiscencia) [12].

La usual medida de la termoluminiscencia es descrita por una curva de intensidad

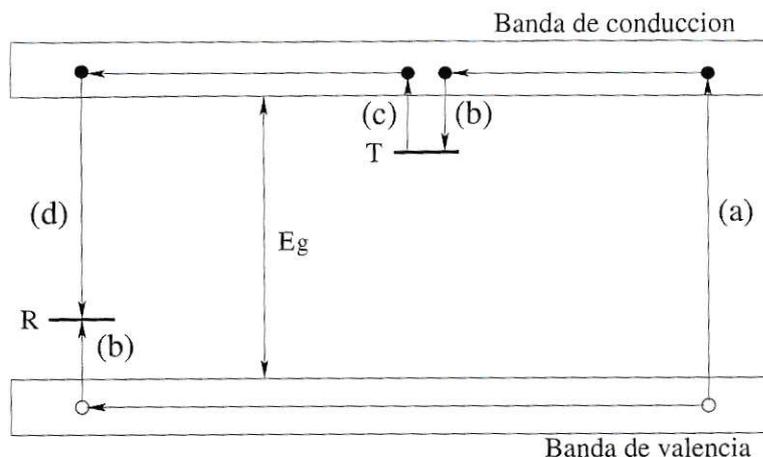


Figura 2.5: Modelo simple del mecanismo de termoluminiscencia con dos niveles. (a) Producción de pares electrón-hueco. (b) Entrampamiento de electrón y hueco. (c) Liberación del electrón gracias a la termoestimulación. d) Recombinación. Los puntos ennegrecidos representan electrones y los puntos blancos, huecos.

de luz vs. temperatura, llamada *curva de brillo* (*glow curve*), que contiene uno o más picos, denominados *glow peaks*. [17].

Uno de los cristales más utilizados, es el fluoruro de litio (LiF) que posee una estructura cristalina regular. Sin embargo, al ser dopado con magnesio y titanio (LiF:Mg,T), se producen imperfecciones en la red. En la vecindad de estas imperfecciones se producen las trampas electrónicas. Cuando un electrón cae en esta trampa, deforma localmente la red, lo que le confiere un estado metaestable. Al aumentar la temperatura, se destraba el rearrreglo local de la red y el electrón puede volver a su estado de baja energía.

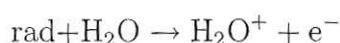
2.3. Radiobiología

2.3.1. Efectos de la Radiación Ionizante

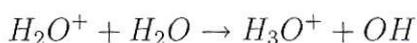
Los efectos biológicos de la radiación ionizante se deben al daño al ADN, pudiendo generar muerte celular, mutación y carcinogénesis. Cuando la radiación es

absorbida por un material biológico, existe la posibilidad de que interactúe directamente con el blanco crítico en las células (el ADN). Los átomos del blanco pueden ionizarse o excitarse produciendo con esto una cadena de eventos que llevan a un cambio biológico. Este tipo de interacción se conoce como **directa** y es la dominante para radiaciones de alta *transferencia lineal de energía* (LET), tales como neutrones, partículas α , etc. Otra alternativa es que la radiación interactúe con otros átomos o moléculas de la célula, especialmente agua, lo que genera la producción de radicales libres los que pueden, a través de difusión en la célula, dañar el blanco crítico. Los radicales libres son altamente reactivos ya que poseen un electrón de valencia desapareado. Este tipo de interacción se conoce como **indirecta** y es producida por radiaciones de baja transferencia lineal de energía.

El modo en que este proceso afecta a la célula es el siguiente: Primero, como resultado de la interacción entre un fotón o una partícula cargada y una molécula de agua, ésta puede ionizarse,



donde H_2O^+ es un ion radical. Estos iones rápidamente se combinan con otra molécula de agua generando el radical hidroxilo, que es altamente reactivo.



El radical hidroxilo puede difundirse dentro de la célula generando daño al ADN. Alrededor de dos tercios del daño biológico producido por radiaciones de bajo LET es producido por acción indirecta [18].

Si el daño celular ocurre y la célula no es capaz de reparar el daño, puede ocurrir que ésta muera (apoptosis), que se vea impedida su reproducción o que se origine una

célula viable pero modificada. Si el número de células de un tejido es suficientemente grande, habrá un daño observable, que se traducirá en la pérdida de funcionalidad del tejido.

En general, la probabilidad de ocurrencia de este tipo de daño es nula para dosis baja pero a partir de cierto valor (el umbral) la probabilidad se incrementa rápidamente hasta llegar a un 100 %. Este tipo de efecto tales como náuseas, enrojecimiento de la piel, cataratas, etc. se denominan determinísticos.

Los efectos **determinísticos** son aquéllos que a partir de un cierto umbral de dosis se presentan en un periodo de tiempo breve después de la exposición y la severidad del efecto se incrementa con la dosis.

Por otro lado, a pesar de la existencia de mecanismos complejos de defensa existe la posibilidad de que la célula sobreviva pero modificada, lo que puede tras un período de tiempo largo y variable, generar cáncer. La probabilidad de cáncer radioinducido aumenta con la dosis, sin embargo la gravedad del efecto es independiente de ésta. Esta categoría de efectos se conoce como estocásticos.

Los efectos **estocásticos** son aquéllos en los que la probabilidad de que ocurran es función de la dosis, mientras que la severidad de los efectos es independiente de ella. No existe un umbral de dosis para efectos de este tipo, porque ellos se producen en células singulares y se asume que siempre existe la más mínima posibilidad de que ocurra un evento aunque la dosis sea pequeña.

Por otra parte los efectos de la radiación se clasifican en:

- Daño Letal, el cual es irreversible, irreparable y lleva a una muerte celular.
- Daño Subletal, el que puede ser reparado en horas siempre que no se vuelva a producir este tipo de daño que eventualmente llevará a una muerte celular.

- Daño Potencialmente letal, en el que las condiciones ambientales posteriores a la irradiación influyen en la muerte de las células. Por ejemplo, el daño potencialmente letal es reparado, si las células luego de la irradiación son incubadas por varias horas en una solución salina balanceada.

Como consecuencia del daño celular, el individuo puede tener a largo plazo los siguientes efectos:

Efecto somáticos los cuales incluyen todos los efectos que se pueden desarrollar durante la vida del individuo, tales como, carcinogénesis, esterilidad, acortamiento de la vida, etc.

Efectos genéticos los que inducen mutaciones a los genes del individuo y ADN que puede contribuir al nacimiento de descendencia defectuosa.

Capítulo 3

Pez Cebra

3.1. Modelo para Estudio de Enfermedades.

Los peces cebra han sido los preferidos a la hora de estudiar enfermedades humanas, incluyendo la carcinogénesis, pues muchos genes involucrados en el ciclo celular, oncogénesis y supresión de tumores son similares en ambas especies; en otras palabras, conservan los genes relacionados con la reparación del ADN.

Además de lo mencionado en el párrafo anterior, hay varias ventajas de usar peces cebra para la evaluación (screen) genética en comparación con modelos genéticos de vertebrados más establecidos, como el ratón. Etapas de desarrollo tempranas son menos accesibles en los ratones porque ocurren en útero.

Otros sistemas establecidos tales como *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans* pueden servir como poderosos modelos para muchos procesos biológicos y son dóciles para largos escaneos, sin embargo, no pueden ser utilizados para estudiar el desarrollo y función de características específicas de los vertebrados, tales como, el riñón, corazón con multicámaras, hematopoiesis multilineal, notocordio y células de la cresta neural [19].

Por otra parte se puede mantener un gran número de peces en un espacio pequeño,

son fáciles de mantener, tienen fertilización externa lo que asegura que todos los pasos del desarrollo del embrión pueden ser accesibles, y un par de peces genera cientos de embriones [20]. El desarrollo del embrión es rápido, con la mayoría de órganos de los sistemas tales como, ojos, cerebro, corazón, riñón, músculos, huesos, y el tracto gastrointestinal evidentes dentro de las primeras 48 horas post fertilización [21]. Finalmente tienen la propiedad **única** de tener embriones ópticamente transparentes. [4].

El daño celular debido a radiación ionizante es un tema de mucho interés actual puesto que cada día la radioterapia se va haciendo más importante como alternativa para tratamiento de cáncer, lo que provoca un mayor interés en la búsqueda de las consecuencias colaterales que este tratamiento trae consigo. Por esta razón el estudio de los efectos nocivos que pueda producir la radiación ha pasado a primer plano, lográndose en este último tiempo grandes avances en lo que a esto se refiere. Para poder hacer un estudio que fuese representativo y comparable a nivel humano, en un comienzo se utilizaban como muestra biológica mamíferos roedores, pero debido a las particulares e interesantes características que posee el pez cebra, su utilización para experimentos de este tipo ha ido *in crescendo* en el transcurso de las últimas décadas [22].

Investigadores observaron, mientras se mantenían los peces en el ambiente del laboratorio, diferentes enfermedades en los peces adultos, incluyendo cáncer. Estudios posteriores revelaron que los peces pueden desarrollar espontáneamente casi cualquier tipo de tumor [23].

3.2. Desarrollo de Embrión

Los estados del desarrollo temprano del embrión son:

- Clivaje (0-2,25 hpf): Es la primera etapa de división celular y toma lugar las primeras 2,25 horas postfertilización (hpf).
- Blástula (2,25-5,25 hpf): Etapa de división celular a partir de 64 células.
- Gástrula (5,25-10,33 hpf): Formación de las tres capas germinales, endodermo, mesodermo y ectodermo.
- Segmentación (10,33-24 hpf): En este estado aparecen los somitos (divisiones longitudinales del mesodermo) y hay un desarrollo temprano del cerebro.
- Faríngrula (24-48 hpf): Se encuentra el notocordo formado, comienza el desarrollo del arco faríngeo, late el corazón y el embrión presenta reflejos al tacto.
- Eclosión (48-72 hpf): El embrión sigue creciendo, la morfogénesis se ralentiza ya que la mayoría de los órganos está formado y comienzan a desarrollarse las aletas.
- Larval (3-21 dpf): Formación de mandíbula y crecimiento.

La fig 3.1 muestra un esquema de las primeras 48 horas del desarrollo del embrión de pez cebra.

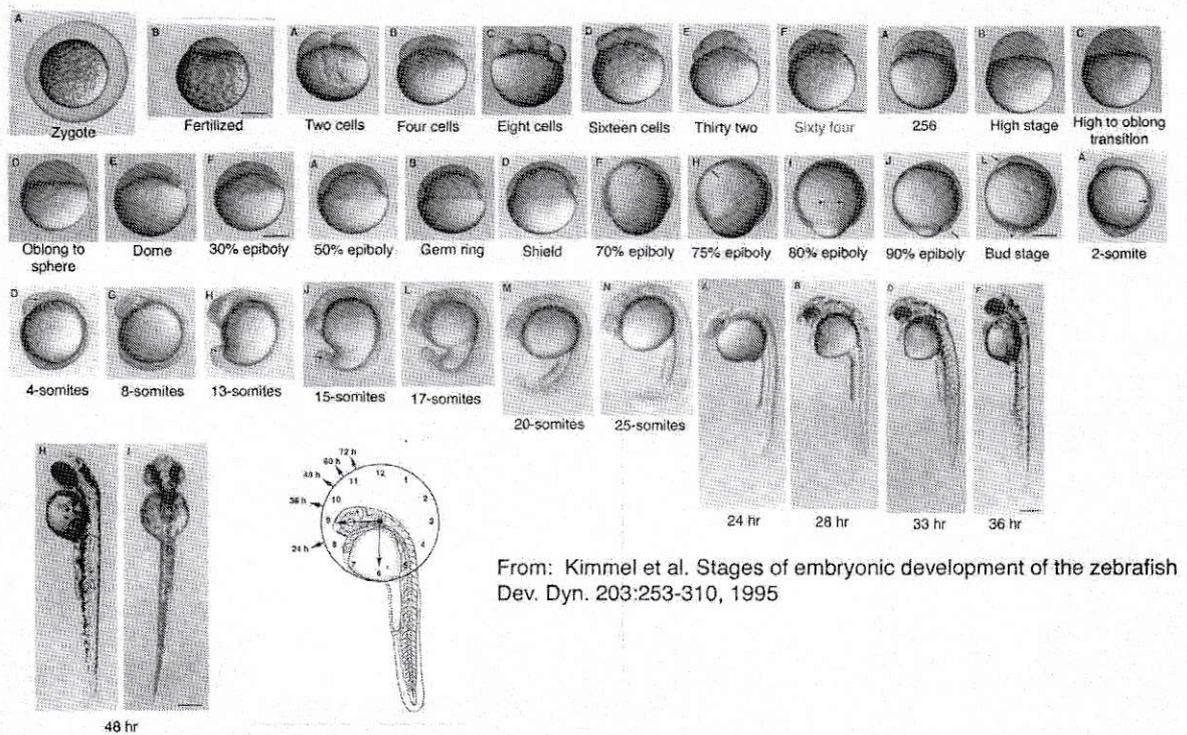


Figura 3.1: Desarrollo del embrión de pez cebra en las primeras 48 horas [24] .

Capítulo 4

Materiales y Métodos

4.1. Procedimiento para Irradiación

4.1.1. Irradiación de TLD

En el control de las dosis suministradas a los embriones, se utilizaron dosímetros termoluminiscentes TEF 100-D, que son TLD-100¹ con 50 % de teflón.

En primera instancia, con el fin de determinar la homogeneidad en la lectura de los dosímetros, se irradiaron simultáneamente los cristales con fotones γ provenientes de una fuente de cesio 137², que pertenece al Laboratorio de Metrología de las Radiaciones Ionizantes (LMRI), de la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN). Los cristales fueron irradiados con una dosis de 1 [mSv] y dispuestos dentro de una bolsa, tal como muestra la figura 4.1.

Posteriormente, para poder leer las dosis guardadas por los cristales, se puso cada uno en la bandeja del lector, mostrada en la fig 4.2, para luego leerlos y obtener la curva de brillo correspondiente.

¹Cristales de fluoruro de litio dopados con magnesio y titanio (LiF:Mg,Ti)

²El ¹³⁷Cs decae por desintegración β^- con un 94,7 % de probabilidad de caer al estado $\frac{11}{2}^-$ donde por emisión de un rayo gamma de energía 661,7 [keV] decae el estado fundamental.

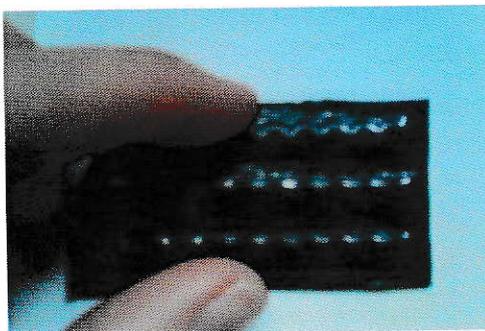


Figura 4.1: Disposición de dosímetros para estudio de homogeneidad.

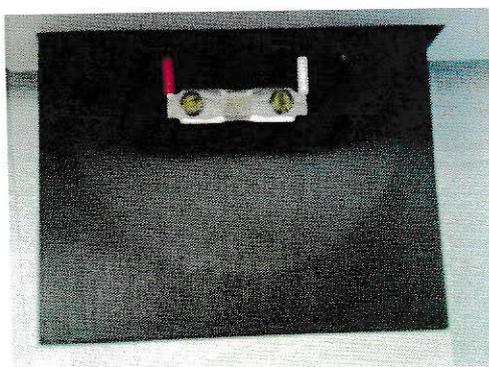


Figura 4.2: Bandeja de Lectura TLD.

El procedimiento para borrar toda dosis remanente en el cristal (annealing), consistió en dejar los cristales durante 3 [h] dentro de un horno a 300 [°C] y luego por 16 [h] más a 80 [°C].

Para el resto de las irradiaciones, se utilizó una fuente de ^{60}Co de la Fundación Arturo López Pérez, por lo que se hizo necesario establecer la relación entre la dosis administrada a los cristales y la carga entregada por el equipo lector de TLD (Hars-haw modelo 3500). Esta relación se pudo obtener a través de la irradiación de los cristales con dosis entre 0,5 y 8 [Gy].

Luego de la calibración de los dosímetros, se realizó un estudio de cómo se distribuía la dosis dentro del campo y para ello se pusieron los dosímetros en las diagonales del cuadrado formado por el campo. Los dosímetros se separaron entre sí a una misma distancia de 5 [cm] (fig. 4.3).

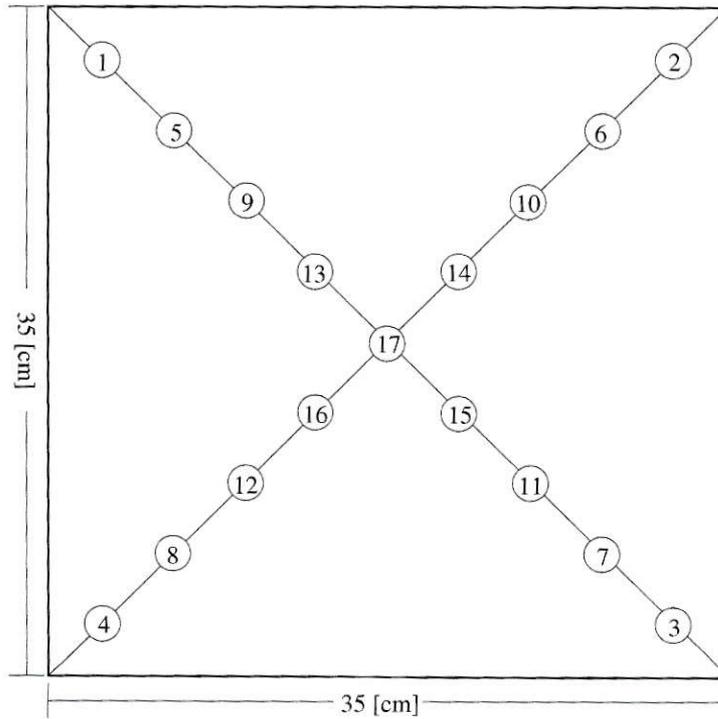


Figura 4.3: Distribución de cristales dentro del campo de radiación.

Por último, siempre que se utilizaron los dosímetros en la mesa experimental para controlar las dosis suministradas, encima de ellos se puso un fantoma de 1 [cm] de agua equivalente (que reemplazaba el centímetro de profundidad de E3, considerado en el cálculo de la dosis).

4.1.2. Características de Irradiador

El cobalto 60 es un isótopo radiactivo, cuya vida media es de 5,27 años. Este elemento decae vía β^- al nivel 4^+ del núcleo de ^{60}Ni con probabilidad de 99,88 % y al nivel 2^+ con 0,12 %. El decaimiento al estado 0^+ es altamente improbable por lo que el decaimiento del níquel se produce en dos etapas. Primero de 4^+ a 2^+ con la respectiva emisión de un fotón de 1,17 [MeV] y luego de este estado al 0^+ con la emisión de un fotón de 1,33 [MeV]. El esquema del decaimiento del ^{60}Co se muestra en la Fig. 4.4 [25].

En los experimentos, se trabajó con un equipo de ^{60}Co para uso médico, específicamente para radioterapia. En la fig 4.5 se muestra el cabezal de un equipo típico de cobaltoterapia. En este caso el modelo usado fue el Theratron Phoenix 127 de Theratronics, que pertenece a la Fundación Arturo López Pérez (FALP).

Este equipo data del 22 de noviembre de 2002, y su actividad inicial fue de $A_0 = 6513$ [Ci].

Para la calibración de esta máquina se utiliza un campo 10×10 [cm²] y para medir la dosis, una cámara de ionización tipo Farmer de 0,6 [cm³], dispuesta a 5 [cm] de profundidad en un fantoma de agua, siguiendo el protocolo 277 del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) [26].

El software que calcula las dosis a administrar es Theraplan Plus versión 3.5, el

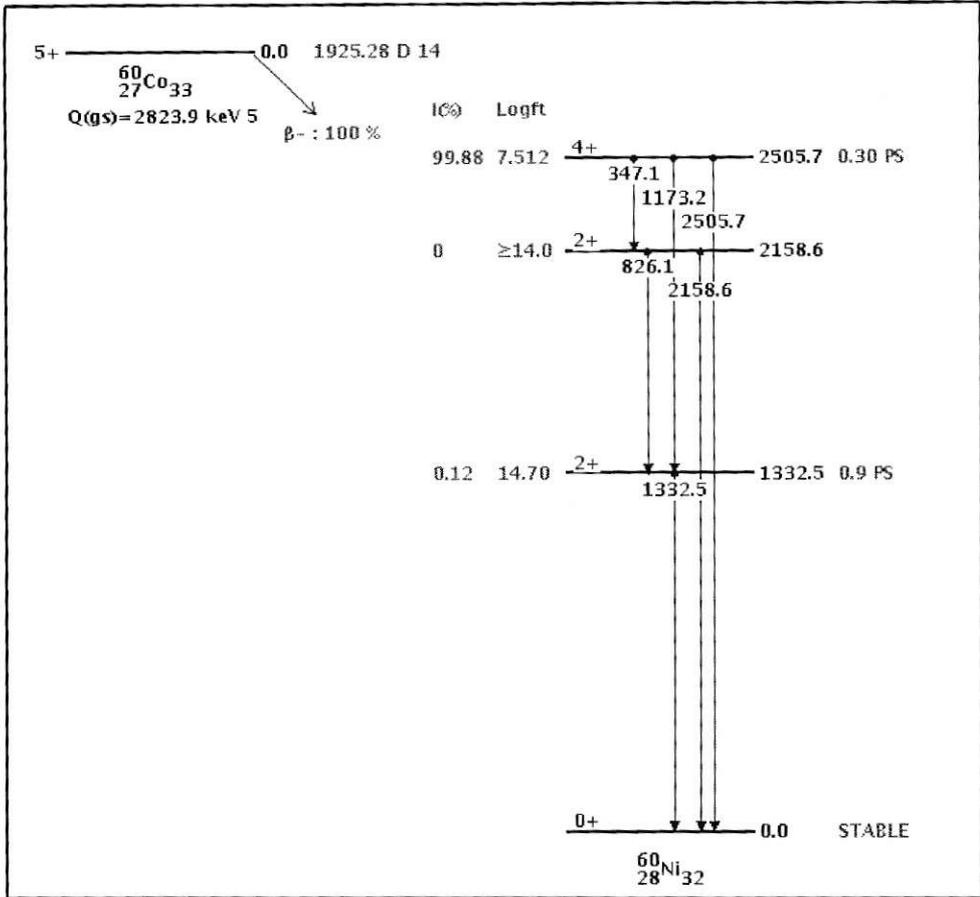


Figura 4.4: Esquema de decaimiento ^{60}Co .

cual presentó un 0,1% de error en comparación con datos entregados por el Organismo Internacional de Energía Atómica, para una medición de prueba realizada por el mismo Organismo.

4.1.3. Irradiación de embriones

Los embriones se transportaron a la Fundación dentro de tubos Falcon de 50 [mL], para mantenerlos sumergidos en el medio durante el traslado. Una vez en la sala de irradiación se cambiaron a placas Petri de 5 [cm] de diámetro y se pusieron varios

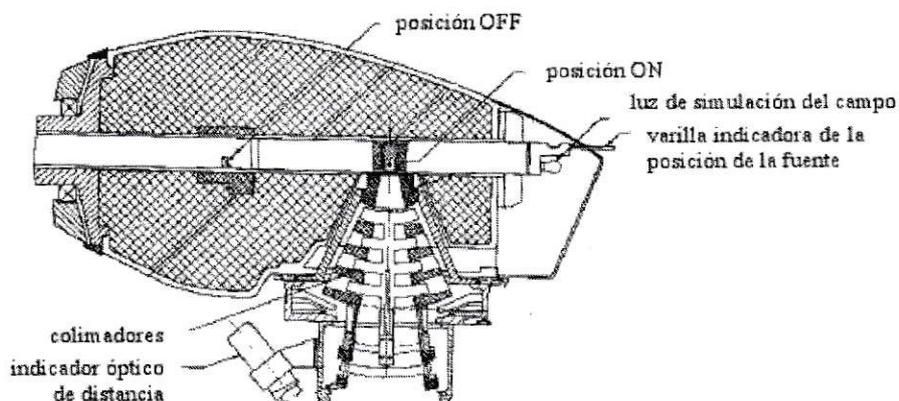


Figura 4.5: Cabezal de una máquina de ^{60}Co .

grupos en la mesa experimental lo más cerca del centro del campo. Se irradiaron simultáneamente y los tiempos de radiación iban en orden ascendente, para que cuando se cumpliera el tiempo correspondiente a cada dosis se fueran sacando de la sala experimental.

Las condiciones de irradiación fueron siempre las mismas y consistieron en:

1. Campo de irradiación de 35×35 [cm²]
2. Distancia fuente superficie (SSD) de 80 [cm]
3. Profundidad de cálculo de 1 [cm], equivalente a la profundidad del medio en el que se encontraron los embriones

Las dosis administradas a los embriones variaron entre 0,5 y 20 [Gy].

Se realizó un experimento en el que se usaron dos placas con la misma cantidad de embriones, una de las cuales estaba protegida por un blindaje de cobre que se encontraba a una distancia de 25,8 [cm] de la base de la camilla, y era sostenido por una placa de acrílico de 1 [cm] de espesor. Esta placa, produjo una disminución

en la dosis, pero para solucionar este percance, el software determinó cuánto tiempo adicional debía considerar para administrar la dosis requerida en la muestra.

El tiempo adicional se obtuvo de considerar un factor de atenuación del material, que en el caso del acrílico fue de 0,932 (esto quiere decir que el acrílico está atenuando un 6,8%). Dicho factor se determinó mediante un fantoma y a 5 [cm] de profundidad de la cara superior de éste, se posicionó la cámara de ionización en el eje central de un campo de 10×10 [cm²]; se midió la carga con y sin el acrílico para posteriormente determinar el factor de transmisión.

En la fig 4.6 se muestra el montaje de la experiencia.

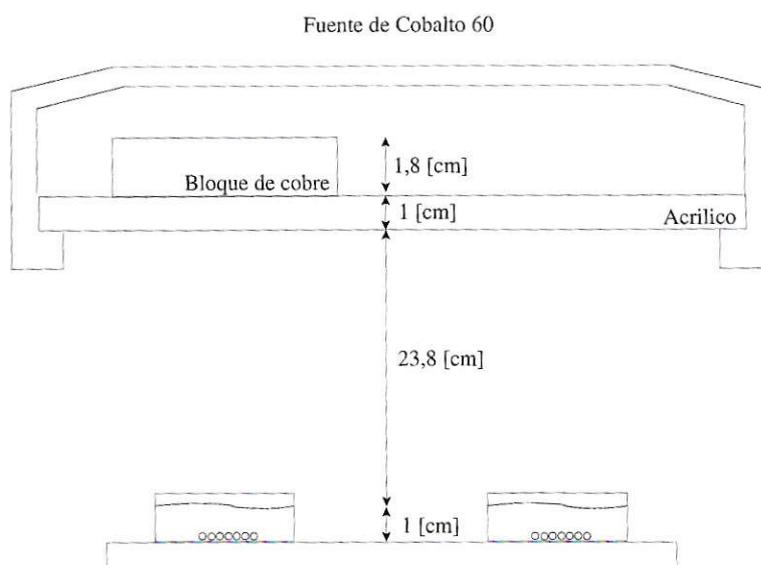


Figura 4.6: Montaje del blindaje de cobre en el campo de radiación, con las respectivas distancias. Los pequeños círculos ilustran los embriones dentro de las placas.

Posteriormente a la irradiación, los embriones se devolvieron a los tubos Falcon para ser transportados a la incubadora (que mantiene la temperatura constante alrededor de 28 [°C]) del laboratorio, donde se mantuvieron en placas Petri de 10 [cm] de diámetro, todo esto con el fin de que siguieran su desarrollo de manera normal.

4.2. Cuidado y Manejo de Peces

Los peces adultos se mantienen en tanques dentro de un vivero que se encuentra en el edificio **Milenio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile**, bajo condiciones estándares determinadas [27]:

1. Ciclo de luz/oscuridad (14 y 10 [h], respectivamente).
2. Temperatura aproximada a los 28,5 [°C].
3. pH entre 7 y 7,3.
4. Conductividad entre 500-600 [$\mu\text{S}/\text{m}$].
5. Dieta alimenticia diaria de Artemia salina suplementada con hojuelas Tetra.

4.2.1. Obtención de Embriones

El pez cebrá tiene la característica de presentar fecundación externa, lo que significa que tanto la hembra como el macho liberan sus gametos al agua donde se produce la fecundación, por lo tanto los cigotos se pueden recolectar utilizando una bandeja, que se ingresa al tanque el día en que se quieren obtener los huevos. Sin embargo, es necesario utilizar un medio para protegerlos de ser comidos por sus padres, es por ello, que se utiliza una bandeja de doble fondo, la que debe ser ingresada al tanque la tarde del día previo al cruce puesto que los peces cebrá se cruzan al amanecer.

Los huevos recolectados se ponían en placas Petri de 10 [cm] de diámetro, que contenía alrededor de 50 [mL] de E3 (5 [mM] NaCl; 0,17 [mM] KCl; 0,33 [mM] CaCl₂; 0,33 [mM] MgSO₄; diluido en dH₂O), el cual es el medio estándar que se utiliza para embriones de peces cebrá.

Se eliminaban de las placas Petri, aquellos huevos no fecundados y muertos, para posteriormente a ello, dividir los sobrevivientes en grupos de igual número que se mantenían dentro de dichas placas.

Alrededor de 2,5 [hpf] los embriones se trasladaban en tubos Falcon de 50 [mL] a la FALP, para ser irradiados a las 3 [hpf].

4.3. Procedimiento Posterior a Irradiación

Estudio de sobrevivencia:

Para el estudio de la sobrevivencia de los embriones irradiados con diferentes dosis, se realizó un seguimiento de los embriones durante 4 días cada 24 horas, en el que se determinó la cantidad de embriones muertos para su posterior eliminación de la placa, con el fin de evitar contaminación del medio, y así asegurar la sobrevivencia del resto de los embriones.

El criterio usado para considerar embriones muertos fue, color gris opaco del embrión y/o detención del corazón.

Estudio de muerte celular:

Para la cuantificación de las células apoptóticas (células con muerte programada) se utiliza comúnmente naranjo de acridina, que es una tinción fluorescente vital (es decir se utiliza en experimentos *in vivo*). El compuesto se une a material genético y puede diferenciar entre ácido desoxirribonucleico ADN y ácido ribonucleico ARN.

Cuando la célula está en proceso de apoptosis, reduce su núcleo y fragmenta el ADN con el fin de alterar lo menos posible el entorno con su muerte y además permitir que fácilmente sean fagocitadas sus partes. Por lo tanto el naranjo de acridina se

intercala en el ADN cuando éste queda expuesto por la apoptosis. En el caso de unión de naranja de acridina con ADN, la radiación emitida es verde y para la unión con ARN la luz emitida es naranja. Los diferentes colores permiten distinguir ADN de ARN [28], es decir, las células apoptóticas emiten luz verde.

Para los embriones irradiados a dosis subletal, se utilizó la tinción Naranja de Acridina (AO³) a una concentración final de 5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] diluida en E3, durante 10 [min]. Posteriormente, se extrajo la solución y se realizaron varios lavados con E3 para eliminar los residuos de AO. En el último lavado se transfirieron los embriones a nuevos pocillos con E3 (esto es debido a que la tinción queda impregnada en el pocillo, impidiendo con esto que se distingan claramente las células teñidas del fondo del pocillo, al mirar a través del microscopio) y se cubrieron con papel de aluminio, para evitar que la tinción se decolorara con la luz [29].

Una vez finalizado el proceso de tinción, los embriones se anestesiaron con triclaína (etil 3-aminobenzoato metanosulfonato) para poder manipularlos y observarlos bajo la lupa fluorescente *Olympus MVX10*.

Finalmente a través del software *QCapture Pro* se fotografiaron los embriones con la cámara *Leica DFC300Fx*, bajo iluminación ultravioleta.

³acridinium chloride hemi- (zinc chloride), Sigma A1121

Capítulo 5

Resultados y Análisis

5.1. Homogeneidad en Lectura de Dosímetros

Los cristales irradiados con 1[mSv] arrojaron los resultados que se muestran en la tabla 5.1.

N° de TLD	Carga [nC]	N° de TLD	Carga [nC]	N° de TLD	Carga [nC]
1	11,6	11	8,3	21	9,6
2	7,8	12	9,1	22	7,5
3	7,4	13	8,9	23	7,1
4	8,5	14	8,6	24	7,6
5	8,6	15	-	25	7,8
6	8,8	16	8,9	26	7,6
7	8,5	17	7,8	27	8,9
8	7,9	18	8,8	28	8,0
9	6,6	19	7,9	29	7,2
10	7,0	20	-		

Tabla 5.1: Datos de Carga entregados para estudio de homogeneidad de lectura de dosímetros. Los números en negrita, corresponden al rótulo del detector.

El gráfico de la figura 5.1, muestra que los valores de carga se distribuyen uniformemente alrededor de la media, cuyo valor es 8,2 [nC], con una desviación estándar de 0,9 [nC], es decir, un coeficiente de variación del 10,8%.

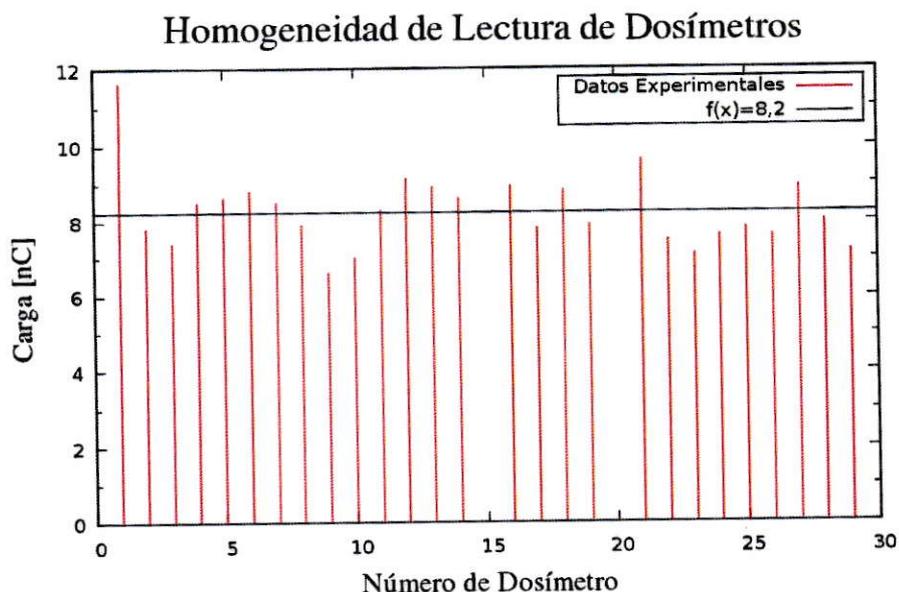


Figura 5.1: Gráfico de la lectura de los dosímetros irradiados a 1 [mSv].

5.2. Calibración Dosímetros Termoluminiscentes (TLD)

Los dosímetros se irradiaron con la fuente de ^{60}Co de la FALP, para realizar la calibración.

Ésta se realizó el 25 de septiembre de 2009, siendo la posterior lectura el 5 de octubre del mismo año. Los resultados obtenidos del lector de dosímetros se muestran en la tabla 5.2, y el gráfico de dichos datos junto con la regresión lineal se muestran en la figura 5.2.

La ecuación de la mejor recta que pasa por los puntos, con un índice de correlación de $R^2 = 0,998$, es:

$$f(x) = 5160,3x \quad (5.1)$$

Dosis [Gy]	Control	0,5	1	2	4	8
Carga [nC]	5,5	2098,0	6640,0	8544,0	17630,0	39340,0
	5,5	1927,0	4487,0	7687,0	17350,0	45840,0
	5,3	2030,0	4512,0	9571,0	18900,0	39820,0
	5,1	2220,0	4176,0	9689,0	23190,0	38400,0
\bar{x} [nC]	5,4	2068,8	4953,8	8872,0	19267,5	40850,0
σ [nC]	0,2	122,9	1134,5	943,0	2700,6	3378,5

Tabla 5.2: Correlación entre Dosis y Carga. Los dosímetros Control, son aquéllos que no fueron irradiados y su lectura estaría mostrando la radiación de fondo (background).

donde x es la dosis en [Gy] y $f(x)$ la carga en [nC].

Luego, para poder obtener el valor de dosis administrado a un cristal termoluminiscente (TL) a partir de la carga entregada por el lector de dosímetros, se utilizará la ecuación 5.1 levemente modificada, ya que ahora la carga corresponde a la variable independiente y la dosis a la dependiente:

$$D = \frac{C}{5160,3} \quad (5.2)$$

donde D es la dosis y C , la carga.

5.3. Dosis entregada por TLD

Los dosímetros se utilizaron en un experimento realizado el día 17 de noviembre de 2009, para corroborar la calibración.

La lectura de ellos se realizó el 27 de noviembre del mismo año y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.3.

Esta tabla muestra un aumento en la carga obtenida por el lector de TLD con respecto a las cargas obtenidas en la tabla 5.2, lo que se traduce en una lectura de dosis mayor.

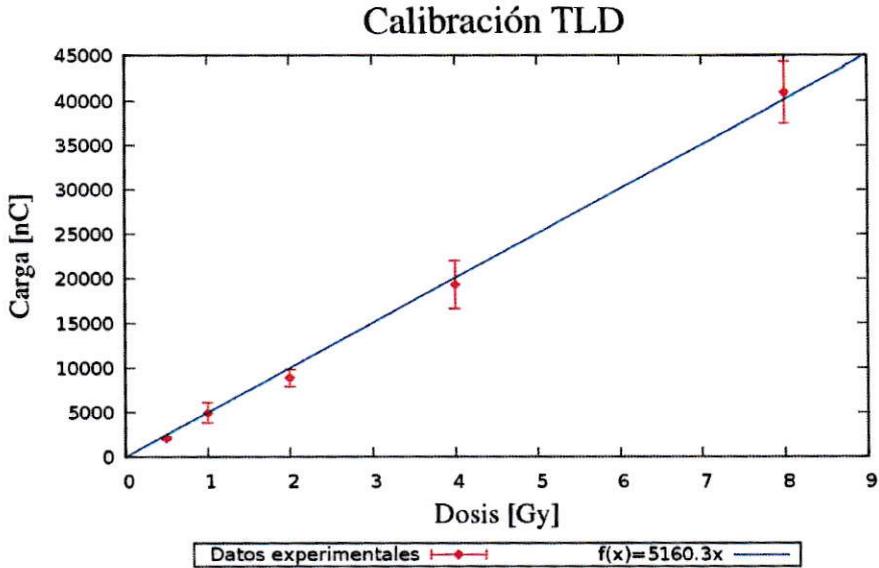


Figura 5.2: Gráfico que muestra la relación entre la dosis administrada y la lectura dosimétrica.

Dosis [Gy]	Control	0,5	1	4	6	8
Carga [nC]	6,6	2806,7	5938,0	23330,0	35610,0	46660,0
	7,2	3263,0	5594,0	23630,0	37770,0	56920,0
	6,0	2550,2	5630,0	22900,0	35150,0	48580,0
\bar{x} [nC]	6,6	2873,2	5720,7	23286,7	36176,7	50720,0
$\pm\sigma$ [nC]	0,5	294,9	154,4	299,6	1142,2	4453,6

Tabla 5.3: Datos de Carga entregados para segundo experimento de control de dosis con TLD.

Por último se realizó un tercer experimento, en el que se irradiaron nuevamente los cristales TL, y los resultados obtenidos en el lector de TLD, se muestran en la tabla 5.4.

Dosis [Gy]	Control	0,5	1	2	4
Carga [nC]	2,3	3657,0	6876,0	14300,0	30150,0
	2,7	4026,0	6757,0	14590,0	31620,0
	2,4	3824,0	7183,0	18560,0	29420,0
	2,5	3553,0	7270,0	14640,0	32430,0
\bar{x} [nC]	2,5	3765,0	7021,5	23286,7	30905,0
$\pm\sigma$ [nC]	0,1	179,0	211,5	299,6	1184,5

Tabla 5.4: Datos de Carga entregados para tercer experimento de control de dosis con TLD.

Nuevamente se observa un aumento de la carga en los dosímetros, incluso en comparación con los datos de la tabla 5.3 que ya mostraban un aumento de lectura, esto puede ser atribuible a una dosis residual en los dosímetros, la que no es eliminada en el proceso de borrado.

Por lo tanto, los dosímetros en este caso no fueron útiles para obtener el valor de dosis absoluto recibido por los embriones, en el experimento que se usa blindaje de cobre, sin embargo sí lo son para obtener dosis relativa (el porcentaje de dosis absorbida por el cobre).

5.4. Distribución de Radiación en Campo

En este estudio se utilizó el montaje mostrado por la fig 4.3 y se obtuvo los resultados mostrados en la tabla 5.5.

Posición de Cristales	N. TLD	Carga [nC]
Radio de 23,0[cm]	1	3001,0
	2	3207,0
	3	3093,0
	4	3377,0
		3169,5±140,27
Radio de 16,5[cm]	5	3950,0
	6	4820,0
	7	4479,0
	8	4607,0
		4464,0±320,78
Radio de 11[cm]	9	3707,0
	10	3962,0
	11	4269,0
	12	5225,0
		4290,8±574,9
Radio de 5,5[cm]	13	5078,0
	14	4679,0
	15	4661,0
	16	5151,0
		4892,3±223,8
Centro	17	5091,0

Tabla 5.5: Datos de Carga entregados para estudio de distribución de dosis en campo.

La variación entre el promedio de los valores de carga de los dosímetros dispuestos en los extremos del campo, mostró una diferencia porcentual con el valor central de un 30%. Por ende para asegurar una distribución homogénea y lo más cercana al máximo de la dosis entregada, los embriones siempre se dispusieron lo más cerca posible del centro del campo.

5.5. Supervivencia de embriones

Para el estudio de supervivencia de embriones se realizaron varios experimentos en los que se fue mejorando la metodología a implementar. De ellos, se muestran dos,

Distribución de Dosis en Campo

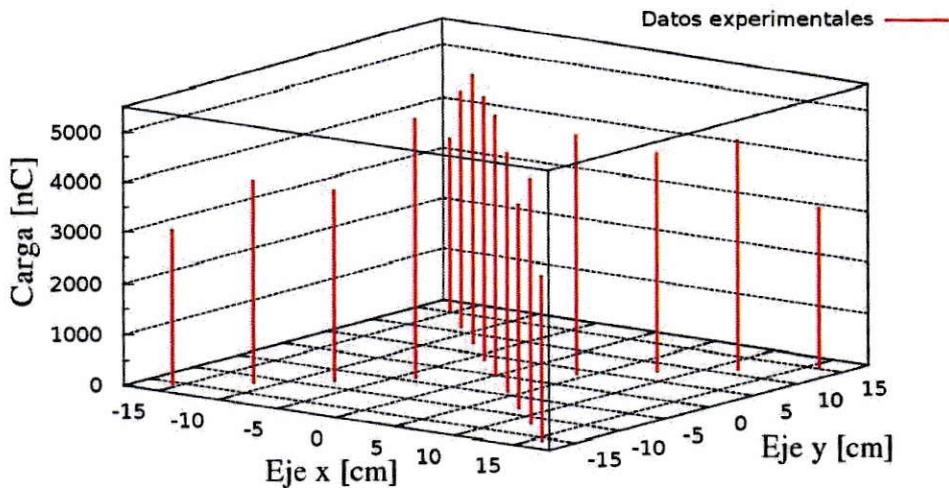


Figura 5.3: Gráfico de la distribución de la radiación en el campo irradiado.

que son los más representativos:

1. Experimento 1.

En esta experiencia, se irradiaron 6 placas con 37 embriones cada una.

La tabla 5.6 muestra los porcentajes de sobrevivencia de los embriones con el transcurso de los días y el gráfico correspondiente se encuentra en fig 5.4.

2. Experimento 2.

En esta experiencia se consideró previo a la irradiación, la mezcla de los embriones provenientes de diferentes tanques y se irradiaron 6 placas con 80 embriones cada una.

La tabla 5.7 muestra los porcentajes de sobrevivencia de los embriones con el transcurso de los días.

Dosis [Gy]	Porcentaje de Supervivencia			
	1 dpf	2 dpf	3 dpf	4dpf
Control	56,8	56,8	56,8	56,8
4	40,5	37,8	32,4	32,4
8	40,5	35,1	27,0	27,0
12	27,0	27,0	10,8	10,8
16	0	0	0	0
20	5,4	5,4	2,7	0

Tabla 5.6: Supervivencia de embriones irradiados, primera experiencia.

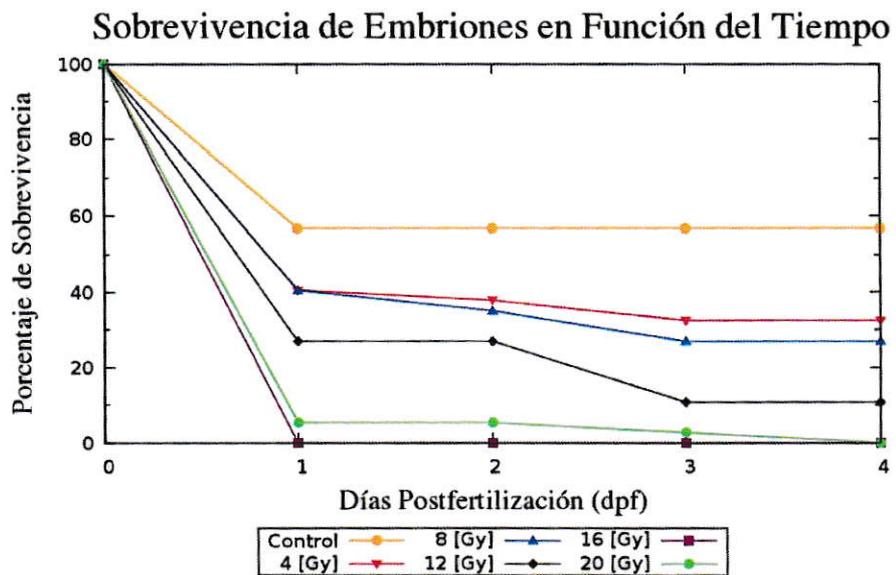


Figura 5.4: Supervivencia de los embriones para el primer experimento.

El gráfico en la figura 5.5 muestra la supervivencia de los embriones en función del tiempo.

Al comparar los 2 gráficos de las figuras de supervivencia de embriones, se puede observar:

1. La dosis 100% letal se encuentra entre 12 y 16 [Gy].

Dosis [Gy]	Porcentaje de Supervivencia				
	1 dpf	2 dpf	3 dpf	4 dpf	5 dpf
Control	82,8	82,8	82,8	82,8	82,8
4	65	65	65	62,5	61,3
8	28,8	23,8	18,8	10,0	5,0
12	10,0	6,3	0	0	0
16	2,5	1,3	0	0	0
20	0	0	0	0	0

Tabla 5.7: Supervivencia de embriones irradiados, segunda experiencia.

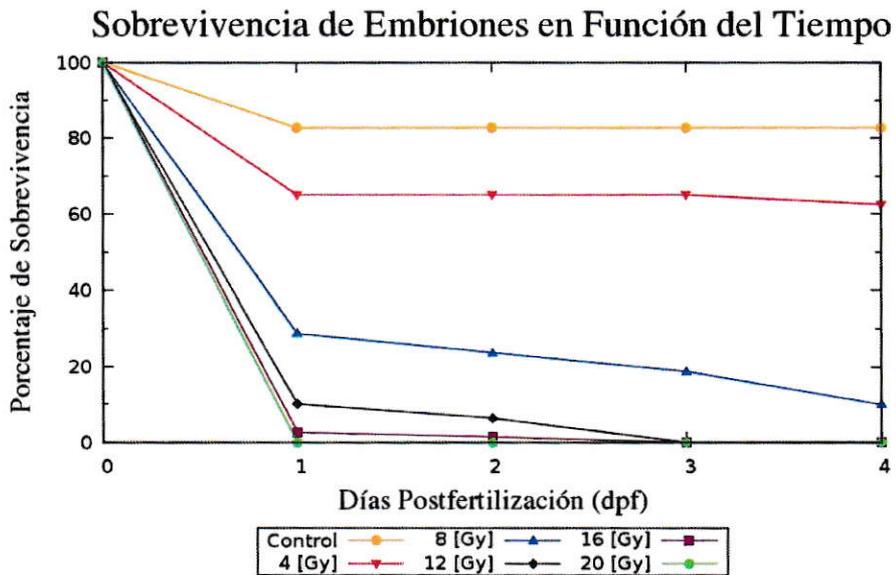


Figura 5.5: Supervivencia de los embriones para el segundo experimento.

- Las curvas presentan una pendiente negativa muy marcada para las primeras 24 horas pero luego se suaviza siendo prácticamente nula para los posteriores días.
- Los embriones control irradiados en la primera experiencia muestran baja supervivencia, por lo que la metodología utilizada en la segunda experiencia fue

más confiable.

- Los embriones irradiados a 20 [Gy] de la primera experiencia sobrevivieron 3 días más que los irradiados a 16 [Gy], lo que puede explicarse por la falta de mezcla de embriones provenientes de distintos tanques.

En base a los resultados previos se consideró que el experimento con la metodología más apropiada fue el segundo.

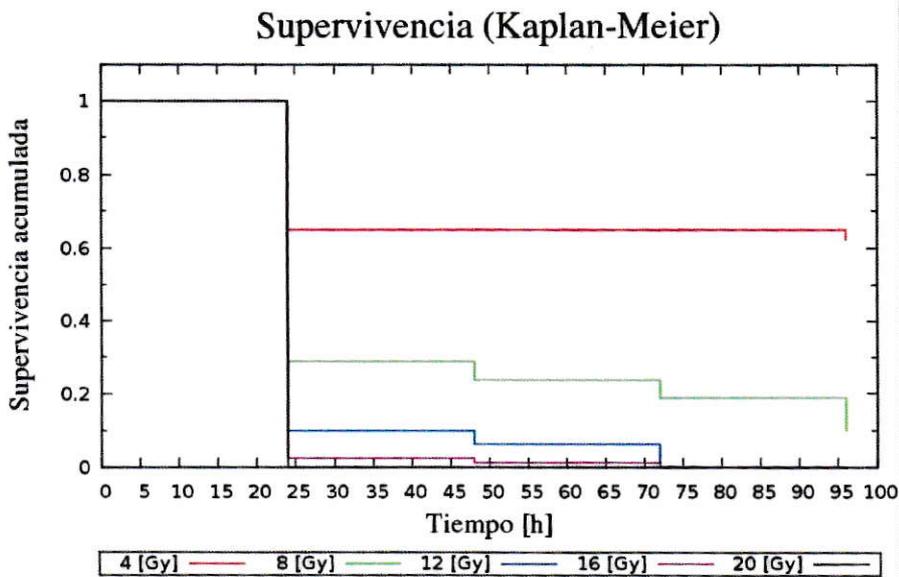


Figura 5.6: Supervivencia de los embriones en función del tiempo, con método de Kaplan-Meier.

De esta experiencia se realizó la curva de supervivencia en función del tiempo, utilizando el método de Kaplan-Meier, que se puede ver en la fig 5.6.

Para poder analizar la incidencia directa de la dosis en la supervivencia del embrión, se realizó un gráfico de supervivencia en función de la dosis, que se muestra en la fig 5.7.

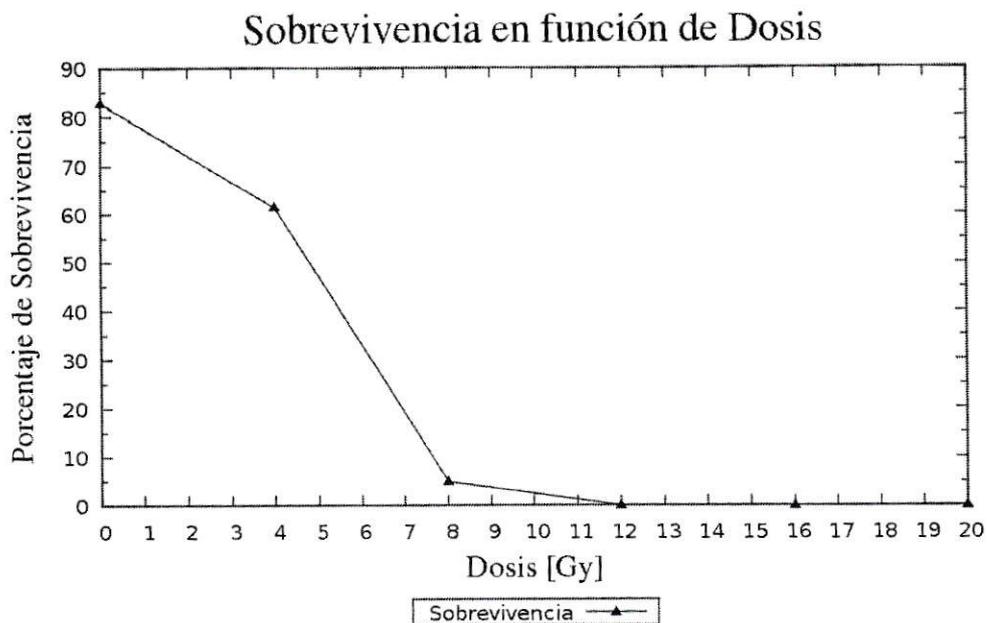


Figura 5.7: Sobrevivencia de los embriones en función de la dosis.

Se puede observar que la curva tiene una tendencia exponencial, por lo que se hizo necesario mostrar dicha curva en escala logarítmica, (fig 5.8). Esta curva muestra una clara tendencia lineal, que es lo esperado para dosis de bajo LET.

A partir de lo anterior, es necesario determinar la dosis que provoca el 50% de letalidad en los embriones, y para ello se utilizó la metodología de Probit, obteniéndose la tabla 5.8.

Dosis	Tasa de Sobrevivencia	Valor Z	probit(P)
4	0,375	-0,32	4,68
8	0,9	1,28	6,28
12	1	5	10

Tabla 5.8: Cálculo de probito

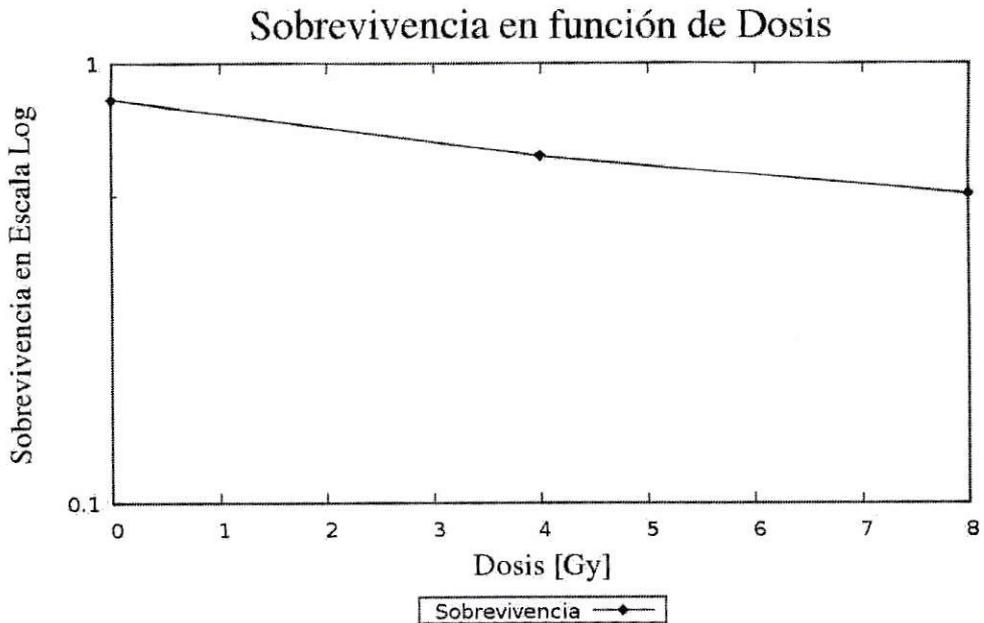


Figura 5.8: Logaritmo de supervivencia de los embriones en función de la dosis.

Se hizo una regresión lineal para los datos del gráfico de probit en función de la dosis (fig 5.9), obteniéndose que la mejor recta que pasa por los puntos fue:

$$y(x) = 0,75x + 0,67$$

donde y es el número que representa el porcentaje de letalidad y x es la dosis en gray.

Por tanto, el valor de dosis que provocó un 50% de letalidad fue de 5,77 [Gy], con una desviación estándar de 1,33 [Gy].

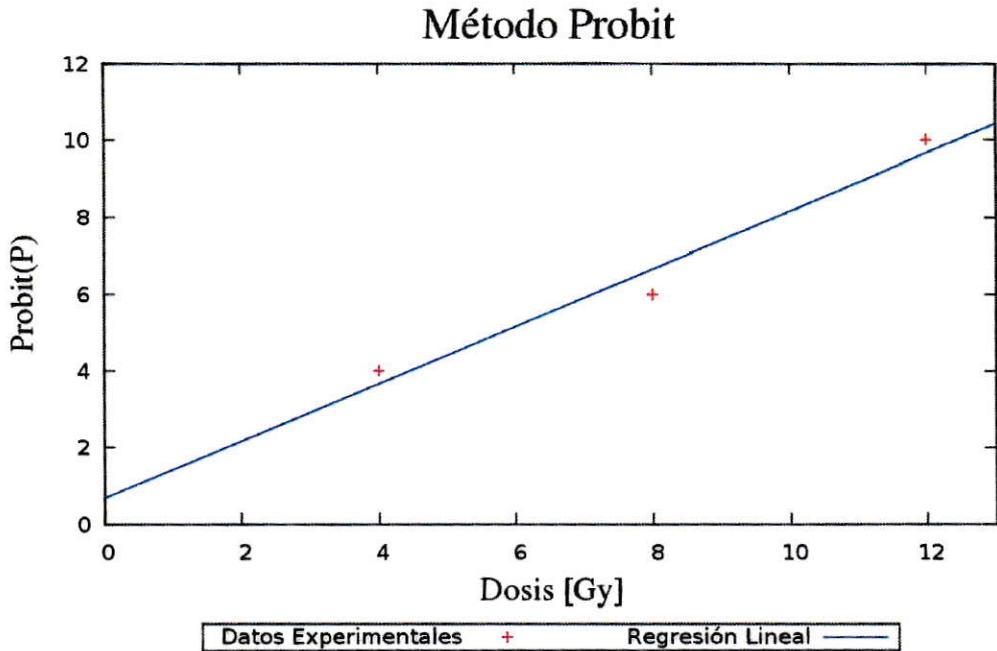


Figura 5.9: Ajuste de datos con método de Probit, para determinar LC_{50} .

5.6. Efectos Subletales

5.6.1. Efectos Morfológicos

Con el fin de poder hacer una comparación de los daños morfológicos de los embriones, en el segundo experimento de sobrevivencia de embriones, se fotografiaron los embriones sobrevivientes a las dosis más bajas (4 y 8 [Gy] respectivamente) junto con los controles, cuando éstos tenían 5 días postfertilización.

La figura 5.10 muestra los embriones irradiados; donde el primero corresponde al embrión no irradiado, el segundo al irradiado a 4 [Gy] y el último a 8 [Gy].

Al comparar las tres imágenes se puede observar:

1. Se presenta un atraso en el desarrollo del embrión, siendo el irradiado a 8 [Gy], el con mayor atraso.



Figura 5.10: Morfología de embriones irradiados. (a) Embrión control, (b) embrión irradiado a 4 [Gy] y (c) embrión irradiado a 8 [Gy].

2. El largo de la cola también disminuye con el incremento de la dosis.
3. Los embriones irradiados presentan una curvatura en la cola.
4. Los somitos del pez control se pueden observar claramente, sin embargo en los irradiados esto no es así.
5. La distribución de los pigmentos es anormal para el embrión irradiado a 8 [Gy].

6. Los embriones irradiados no presentan vejiga natatoria.
7. El ojo de los embriones irradiados es más pequeño.
8. Prácticamente no hay formación de mandíbula en los embriones irradiados.
9. El embrión irradiado a 4 [Gy] presenta edema pericardiaco.

5.6.2. Muerte Celular

Para poder comparar los efectos de la radiación entre embriones irradiados a una misma dosis, con y sin blindaje de cobre, en primer lugar se calculó cuánto debía atenuar dicho blindaje.

Considerando que la densidad del cobre es $\rho = 8,4 \text{ [g/cm}^3\text{]}$, el espesor utilizado fue de 1,48 [cm] y que para la energía de los fotones usados, el coeficiente de atenuación másico es $\mu_\rho = 5,54 \times 10^{-2} \text{ [cm}^2\text{/g]}$, se tiene que de la ec (2.1) la atenuación del haz es de un 57%. Esta atenuación está considerando solamente la disminución en la intensidad del haz, puesto que los rayos X producidos dentro del cobre, se atenúan dentro del mismo y prácticamente no salen de él, por lo que son despreciables respecto a los fotones γ provenientes de la fuente.

Se utilizaron los dosímetros TL para obtener la razón entre la dosis recibida por los embriones protegidos y por los no protegidos, de tal manera de poder comparar con el valor teórico.

Los resultados se muestran en la tabla 5.9

De ella se puede obtener una nueva tabla, en la que se muestra la razón de atenuación del cobre, para cada dosis (tabla 5.10).

El porcentaje de atenuación del blindaje debiera ser constante, puesto que no hay variación del material ni de la energía de los fotones incidentes, lo que se puede

Dosis Administrada	Carga medida por lector de TLD [nC]	
	TLD protegidos con Cu	TLD no protegidos
2 [Gy]	5378,0	10720,0
	5578,0	12710,0
	5478,0	11715,0
4 [Gy]	10650,0	22160,0
	9668,0	22230,0
	10159,0	22195,0
8 [Gy]	20360,0	37190,0
	14710,0	50170,0
	17535,0	43680,0

Tabla 5.9: Datos de Carga entregados para experimento de irradiación con blindaje de cobre. Los números en negrita, son los promedios de las lecturas para cada dosis.

Dosis Administrada [Gy]	Porcentaje de Atenuación
2	53,2
4	54,2
8	59,9

Tabla 5.10: Porcentaje de atenuación de blindaje de cobre.

observar en la tabla 5.10. Por lo tanto se calculó el promedio de los tres porcentajes, obteniéndose una atenuación del 55,8%.

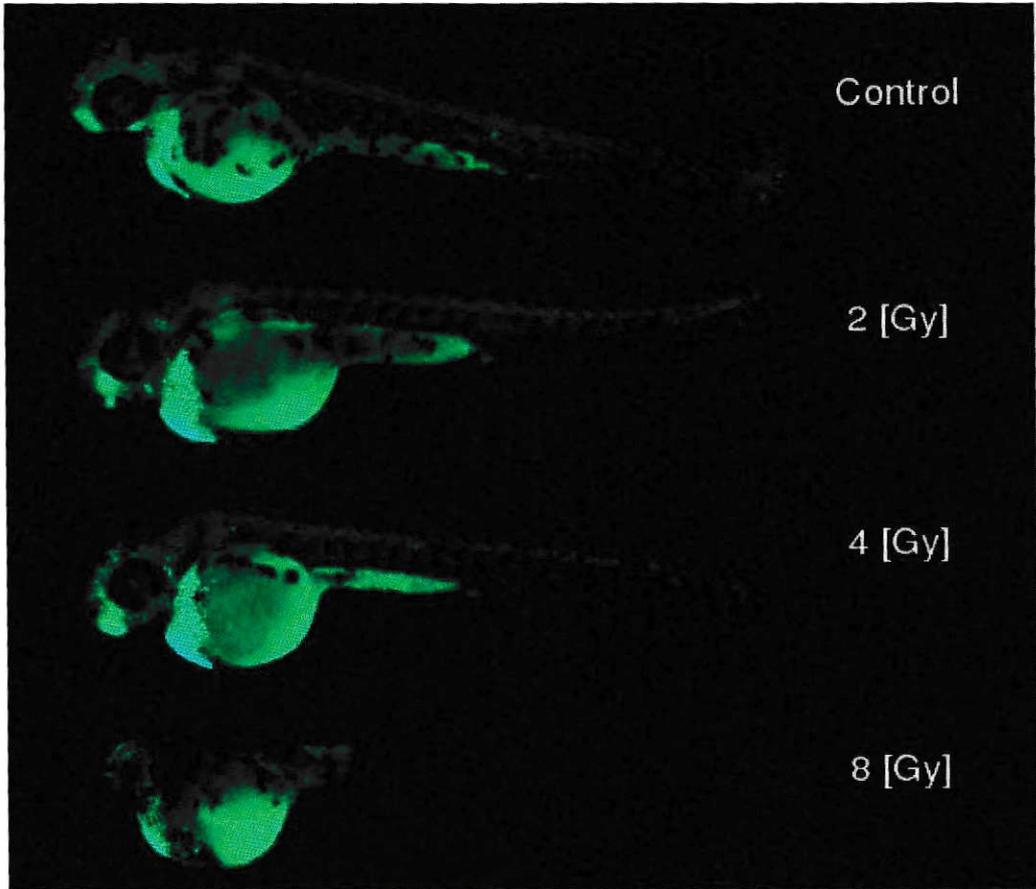


Figura 5.11: Muerte celular de embriones irradiados.

En segundo lugar, se estudió la muerte celular en embriones irradiados sin protección de cobre, y posteriormente se comparó con los embriones protegidos.

La imagen de la fig 5.11, corresponde a embriones irradiados sin protección, en la cual se puede observar claramente el aumento del número de células muertas, con el incremento de la dosis.

Las imágenes mostradas en las figuras 5.12, 5.13 y 5.14, corresponden a las comparaciones de los embriones sin protección con los protegidos.

En las figuras 5.12 y 5.13 se puede observar que la cantidad de células muertas, es siempre superior en el caso de los embriones no protegidos.

En la figura (5.14), la diferencia de células muertas entre las dos imágenes no es muy notoria, puesto que se hace más difícil comparar porque el embrión sin protección tiene efectos agudos en su desarrollo.

Por tanto, el cobre está protegiendo de efectos tanto a niveles microscópicos (muerte celular) como macroscópicos (morfológicos).

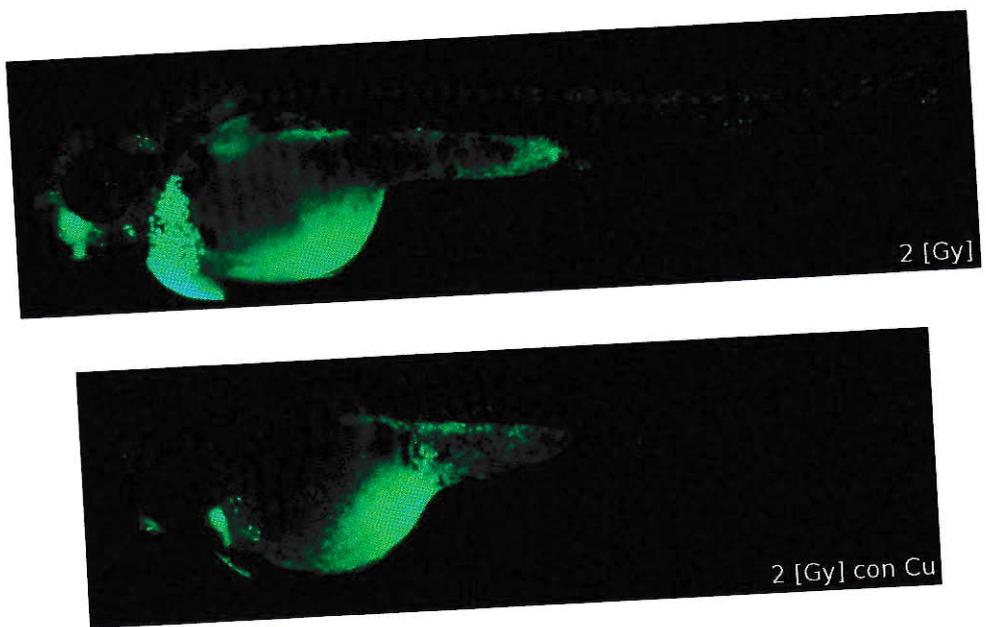


Figura 5.12: Comparación de muerte celular de embriones irradiados a 2 [Gy].

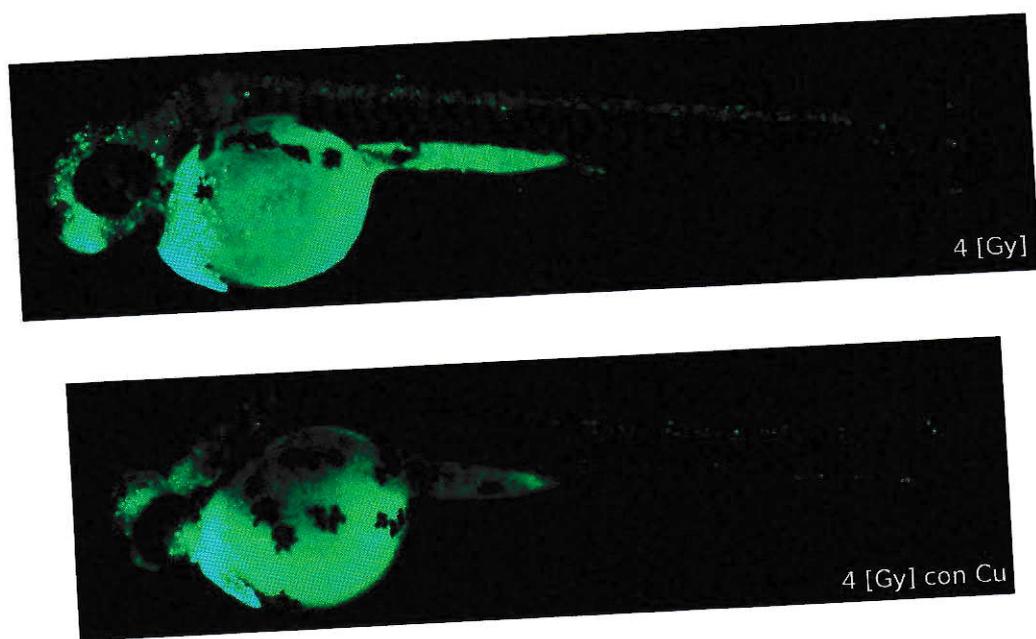


Figura 5.13: Comparación de muerte celular de embriones irradiados a 4 [Gy].

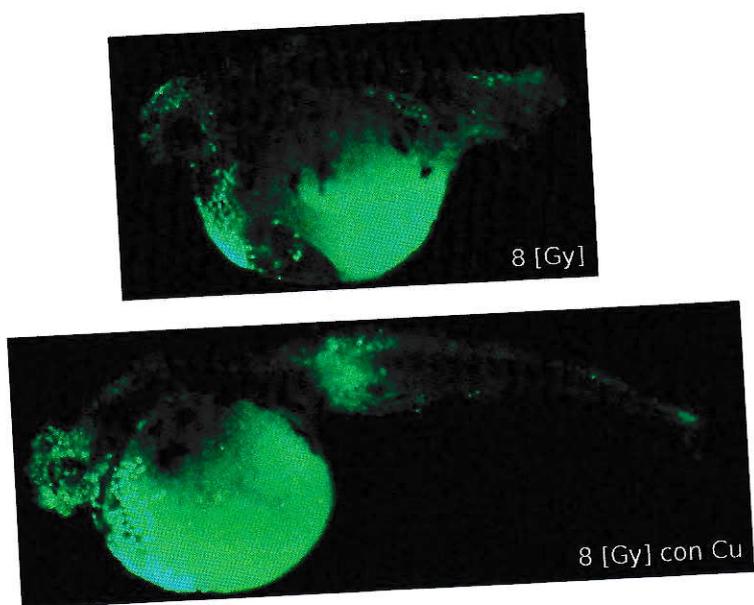


Figura 5.14: Comparación de muerte celular de embriones irradiados a 8 [Gy].

Capítulo 6

Conclusiones

En este trabajo se comprobó que el embrión de pez cebra es una herramienta útil para estudios de enfermedades humanas, particularmente estudios de efectos de radiación ionizante. Por tanto es de suma importancia en primera instancia determinar cuál es la respuesta general de los embriones a la radiación, en términos de letalidad, ya sea para diferentes estadios del embrión como para diferentes dosis.

Se estudió la dosis que produce un 100% de letalidad en el embrión del pez de un estadio particular (3 hpf), llegándose a que ésta se encuentra entre 12 y 16 [Gy].

La dosis que produce un 50% de letalidad en los embriones se obtuvo a través del método Proit y resultó ser de $5,77 \pm 1,33$ [Gy].

Los efectos en el desarrollo del embrión, fueron siempre *in crescendo* con la dosis, presentándose típicamente, retraso en el desarrollo, acortamiento y deformación de cola, disminución del tamaño de la cabeza y ojos, distribución atípica de pigmentos y por último formación de edemas.

En la experiencia de irradiación de embriones a dosis relativamente bajas (entre 2 y 8 [Gy]), se estudió la eficacia de un blindaje de cobre en términos de protección contra los nocivos efectos de la radiación, determinándose que la aplicación de éste,

efectivamente disminuyó la muerte celular y los efectos a nivel macroscópicos.

Se estudió en principio, la posibilidad de utilizar dosímetros termoluminiscentes para el control de las dosis administradas a los embriones, sin embargo, se descubrió que las lecturas posteriores a cada irradiación, no eran constantes (como cabe esperar), sino que iban en aumento con el uso, a pesar de que entre cada uno de ellos se realizaba un proceso de annealing (borrado).

Este incremento en la dosis entregada por los dosímetros, se puede atribuir a un proceso de annealing no efectivo, quedando con esto una dosis residual.

El uso de TLD finalmente fue útil para obtener el porcentaje de atenuación del blindaje de cobre, puesto que independiente del aumento en los valores de dosis entregados por ellos, el comportamiento del conjunto de cristales resultó ser homogéneo, con un coeficiente de variación de un 10,9%. Esto implica que la razón entre los valores de dosis entregados por los dosímetros no protegidos y protegidos, es efectivamente representativa de la tasa de atenuación del blindaje de cobre utilizado, resultando ser ésta de un 55,8%.

Referencias

- [1] L. V. Venkatamaran, *Current Science* págs. 355–356 (1974).
- [2] F. S. S. Chakrabarti, G. Streisinger y C. Walker, *Genetics* págs. 109–123 (1983).
- [3] C. Walker y G. Streisinger, *Genetics* págs. 125–136 (1983).
- [4] M. F. McAleer y col., *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* págs. 10–13 (2005).
- [5] P. Marmier y E. Sheldon, *Physics of Nuclei and Particles* (Academic Press, INC, 1969), primera edición.
- [6] W. N. Cottingham y D. A. Greenwood, *An Introduction to Nuclear Physics* (Cambridge University Press, 2001), segunda edición.
- [7] W. E. Burcham, *Física Nuclear* (Editorial Reverté S.A., 1974), segunda edición.
- [8] A. Das y T. Ferbel, *Introduction to Nuclear and Particle Physics* (World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2003), segunda edición.
- [9] J. E. Turner, *Atoms, Radiation and Radiation Protection* (Wiley-VCH, 2007), tercera edición.
- [10] H. E. Johns y J. R. Cunningham, *The Physics of Radiology* (Charles C. Thomas, 1983), cuarta edición.

- [11] A. McNair, Radiation quantities and units, Inf. Téc. Report 33, International Commission on Radiation Units and Measurements (1980).
- [12] E. Podgorsak y col, *Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students*. (IAEA, 2005).
- [13] J. A. Sorenson y M. E. Phelps, *Physics in Nuclear Medicine* (W.B. Saunders Company, 1987), segunda edición.
- [14] F. H. Attix, *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry* (Wiley-VCH, 1986), primera edición.
- [15] A. J. J. Boss, *Radiation Measurements* **41**, S45 (2007).
- [16] R. Chen y S. W. S. McKeever, *Theory of Thermoluminescence and Related Phenomena* (World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 1997).
- [17] G. Trigg y R. Lerner, *Encyclopedia of Physics* (VCH Publishers, 1991), segunda edición.
- [18] E. J. Hall, *Radiobiology for the Radiologist* (J.B. Lippincott Company, 1994), cuarta edición.
- [19] K. Dooley y L. I. Zon, *Current Opinion in Genetics and Development* **10**, 252 (2000).
- [20] J. Briggs, *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative Comparative Physiology* págs. R3–R9 (2002).
- [21] G. Geiger y col., *Cancer Research* **66**, 8172 (2006).
- [22] G. Lieschke y P. Currie, *Nature Reviews Genetics* págs. 353–367 (2007).

- [23] H. Feitsma y E. Cuppen, *Molecular Cancer Research* **6**, 685 (2008).
- [24] S. K. B. U. Charles Kimmel, William Ballard y T. Schilling, *Developmental Dynamics* **203**, 253 (1995).
- [25] NNDC, *National Nuclear Data Center*, <http://www.nndc.bnl.gov>.
- [26] Colaboradores, Absorbed dose determination in photon and electron beams, an international code of practice, Inf. Téc. 277, International Atomic Energy Agency (1987).
- [27] C. Nüsslein-Volhard y R. Dahm, *Zebrafish: Practical Approach* (Oxford University Press, 2002).
- [28] K. L. Lerner y B. W. Lerner, *World of Microbiology and Immunology* (Gale Group Inc., 2003), primera edición.
- [29] B. Tucker y M. Lardelli, *Zebrafish* **4**, 113 (2007).