

## EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS Y EL CONTENIDO DE DNA EN EMBRIONES MURINOS CULTIVADOS CON URANIO

KUNDT, M.S. & CABRINI, R.L.

Dept. de Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica, LANAIS-MEF (CONICET).

### Resumen:

La evaluación del grado de desarrollo, el número de células alcanzado y el contenido de DNA, fueron utilizados para evaluar la embriotoxicidad del uranio. Los embriones fueron puestos a cultivar desde el estadio de una célula, con nitrato de uranilo hexahidratado (NU) a una concentración final de uranio (U) de 26, 52 y 104  $\mu\text{U/ml}$ . A las 24 hs de cultivo, los embriones que se encontraban en el estadio de 2 células, fueron puestos en nuevas placas con concentraciones idénticas a las del día anterior hasta finalizar el período de incubación de 72 hs. El recambio de medio se realiza dado que el uranio se compleja con los componentes del medio de cultivo formando complejos no difusibles y que el ARNm del embrión comienza a sintetizarse en la mitad del estadio de dos células. A las 72 hs de cultivo el 87% de los embriones control se encontraba en el estadio de mórula compacta y en aquellos cultivados con uranio, el porcentaje disminuía significativamente a 77; 63,24 y 40,79% respectivamente. Aquellos embriones que presentaban una morfología normal, fueron seleccionados y fijados sobre portaobjetos. Para la evaluación del número de células alcanzado por embrión, se empleó la tinción de Giemsa y para la evaluación del contenido de DNA se realizó un estudio citofotométrico empleando la tinción de Feulgen. El número de células disminuyó significativamente desde  $20,3 \pm 5.6$  en el control a  $19 \pm 6$ ;  $14 \pm 3$  y  $13.9 \pm 5.6$  en las diferentes concentraciones. Todos los embriones analizados mostraban un corpúsculo polar fácilmente reconocible, el cual fue utilizado como indicador de ploidía n. El contenido de DNA fue medido sobre un total de 20 embriones control y 16 embriones cultivados con NU. En los embriones control, se observó que el 92,7% de los núcleos presentaban una ploidía normal desde  $2n$  a  $4n$ , siendo un 2,9% núcleos hipoploides y un 4,4% núcleos hiperploides. La hipoploidía se incrementa de forma dosis dependiente en los embriones cultivados con NU: 3,45; 44,45 y 50,34% en las distintas concentraciones. Los resultados indican, que el U es embriotóxico y sus efectos son dosis dependientes a las concentraciones empleadas en este estudio y que aún aquellos embriones que presentan una morfología normal, pueden estar genéticamente afectados. El modelo empleado ha sido sumamente sensible pudiendo ser utilizados los embriones de preimplantación, como un modelo frente a posibles agentes mutagénicos en la industria nuclear.

## EVALUATION OF CELL NUMBER AND DNA CONTENT IN MOUSE EMBRYOS CULTIVATED WITH URANIUM

### Abstract

The evaluation of the degree of development, the number of cells and the DNA content, were used to evaluate the embryotoxicity of uranium. Embryos at a one cell stage were cultured with uranyl nitrate hexahydrate (UN) at a final concentration of uranium (U) of 26, 52 and 104  $\mu\text{gU/ml}$ . At 24 hs of culture, the embryos at the 2 cell stage, were put in

new wells with the same concentrations of U as the previous day, until the end of the period of incubation at 72 hs. At 72 hs of culture, 87% of the original one cell embryos were at morula stage, and in those cultivated with uranium, the percentage decreased significantly to 77; 63.24 and 40.79% respectively for the different U concentrations. Those embryos that exhibited a normal morphology, were selected and fixed on slides. The number of cells per embryo was evaluated in Giemsa stained preparations. The DNA content was evaluated cytophotometrically in Feulgen stained nuclei. The number of cells decreased significantly from  $20,3 \pm 5.6$  in the control to  $19 \pm 6$ ;  $14 \pm 3$  and  $13.9 \pm 5.6$  for the different concentrations. All the embryos evaluated showed one easy recognizable polar body, which was used a haploid indicator (n). The content of DNA was measured in a total of 20 control embryos and 16 embryos cultivated with UN. In control embryos, 92,7% of the nuclei presented a normal ploidy from 2n to 4n, 2,9% nuclei were hypoploid and 4,4% were hyperploid. The percentage of hypoploid nuclei rose in a dose-dependent fashion to 3.45; 44.45 and 50.34% respectively for the embryos cultured at the different U concentrations. The results indicate that U is embryotoxic, that its effects are dose dependent at the concentrations used in this study and that even those embryos that show a normal morphology, can be genetically affected. We show that the model employed is extremely sensitive. It is possible to use the preimplantation embryos, as a model to test the effect of possibly mutagenic agents of the nuclear industry.

### **Objetivo:**

Evaluar la embriotoxicidad del uranio, utilizando como indicadores el grado de desarrollo, el número de células alcanzado y el contenido de DNA, durante un período de 72 hs de cultivo con NU a una concentración final de U de 26, 52 y 104  $\mu\text{U/ml}$ .

### **Procedimientos:**

Los embriones de preimplantación, han sido sumamente empleados para la evaluación de los efectos de metales y contaminantes de la industria nuclear sobre las células de mamíferos (1, 2, 3). Para este trabajo, se emplearon embriones de una célula obtenidos de hembras híbridas (CBAXC57) apareadas con machos NIH. Los embriones fueron puestos a cultivar desde el estadio de una célula, en estufa gaseada con 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , a una concentración final de uranio de 26, 52 y 104  $\mu\text{U/ml}$ . A las 24 hs de cultivo, los embriones que se encontraban en el estadio de 2 células, fueron cambiados a una placa preparada nuevamente, manteniendo las mismas concentraciones de uranio que la anterior, hasta finalizar el período de incubación de 72 hs (4). Aquellos embriones que presentaban una morfología normal, fueron seleccionados y fijados sobre portaobjetos (5), para el conteo de células por embrión se empleó la tinción de Giemsa. La evaluación del contenido de DNA se realizó mediante un estudio citofotométrico empleando para ello la tinción de Feulgen utilizando como indicador de ploidía al corpúsculo polar. La medición del ADN en el corpúsculo polar tiene una media de 30.88 TOD (Total Optical Density)  $\pm 2.9$ . Por tal razón fue tomado el valor de TOD 30.88 como 1 n (6).

### **Resultados:**

Los resultados obtenidos muestran que a las 72 hs de cultivo, en los embriones cultivados con NU, la calidad embrionaria disminuye, evidenciándose morfológicamente: detención del desarrollo, asincronía en los tiempos de la división

celular, lisis y fragmentación celular (Figura 1). El porcentaje de embriones que alcanzó el estadio de mórula fue un 86% en el control y un 77; 63,24 y 40,79 % en las concentraciones de 26, 52 y 104  $\mu\text{U}/\text{ml}$ , siendo estas diferencias significativas mediante el análisis de  $\chi^2$ . En aquellos embriones cultivados con NU que mostraban una morfología normal, el número de células alcanzado fue de  $19 \pm 6$ ,  $14 \pm 3$  y  $13.9 \pm 5.6$  en las concentraciones de 26, 52 y 104  $\mu\text{U}/\text{ml}$  respectivamente, siendo las diferencias estadísticamente significativas respecto de los embriones control  $20,3 \pm 5,6$  (Tabla 1). Respecto al contenido de DNA, asignándole un valor haploide  $1n$  al corpúsculo polar, los resultados muestran que de 384 núcleos pertenecientes a embriones control analizados, el 92.7% tenía una ploidía de  $2n$  a  $4n$ , el 2.9% de los núcleos eran hipoploides y el 4.4 % eran hiperploides (Figura 2). En aquellos embriones cultivados con nitrato de uranilo el porcentaje de núcleos con ploidía  $2n$  a  $4n$  era de 93.1%, 55.55% y 48.34% para las concentraciones de 26, 52 y 104  $\mu\text{U}/\text{ml}$  respectivamente. El porcentaje de núcleos hipoploides encontrados fue de 3.45%, 44.45% y 50.34% y el porcentaje de núcleos hiperploides fue de 3.45%, 0% y 1.32% para las concentraciones indicadas. Las diferencias son estadísticamente significativas respecto de los controles (Tabla 2). En todos los casos, para el análisis de DNA, los embriones presentaban un corpúsculo polar visible.

### **Conclusiones:**

Los embriones cultivados con nitrato de uranilo, han mostrado un deterioro en el desarrollo embrionario a las concentraciones empleadas. Se observa una disminución en el número de células por embrión y un incremento de las hipoploidías respecto de los controles, en aquellos embriones cultivados con uranio, siendo los efectos observados dosis dependiente. Las concentraciones de uranio empleadas, han demostrado ser embriotóxicas, aún sobre los embriones que presentaban una morfología normal. El corpúsculo polar muestra ser un excelente indicador para estudios de ploidía embrionaria, pudiendo ser utilizados los embriones de preimplantación, como modelo de estudio frente a posibles agentes mutagénicos en la industria nuclear.

### **Referencias:**

1. Müller, W.U. and Streffer, C. (1987). Risk to preimplantation mouse embryos of combinations of heavy metals and radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 51:997-06.
2. Müller, W.U. and Streffer, C. (1988). Time factors in combined exposures of mouse embryos to radiation and mercury. *Radiat. Environ. Biophys.*, 27:115-21.
3. Hanna, L. A., Peters, J. M., Wiley, L. M., Clegg M. S. and Keen, C. L.. (1997). Comparative effects of essential and nonessential metals on preimplantation mouse embryo development in vitro. *Toxicology*, 116:123-31.
4. Kundt, M.S, Ubios, A.M., Cabrini, R.L. (2000). Effects of uranium poisoning on cultured preimplantation embryos. *Biol. Tr. Elem. Res.* 75:235-244.
5. Tarkowski, A. K. (1966) An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics*, 5:394-400.

6. Kundt, M.S, Cabrini, R.L, Kirschbaum, W.F. (2000 a). El corpúsculo polar como indicador de ploidía preimplantacional. Presentado en: Biología de la Reproducción Animal y del Desarrollo Embrionario. Fac. Cs. Vet. UBA. Trabajo 21, del 27-29 de marzo.

**Tabla 1**

Efecto del nitrato de uranilo sobre la proliferación celular de embriones cultivados in vitro. Las células por embrión fueron contadas a las 72 hs. de cultivo en el estadio de mórula.

Tratamiento		Nro de células/embrión $x \pm SD$	Nro de embriones
72 hs.	Control	20.3 $\pm$ 5.6	28
	26 $\mu$ gU/ml	19.0 $\pm$ 6.0	17
	52 $\mu$ gU/ml	**14.0 $\pm$ 3.0	18
	104 $\mu$ gU/ml	*13.9 $\pm$ 5.6	11

\*\*Diferencia significativa desde el grupo control,  $p < 0.0001$  utilizando el Test de Student.

\* Diferencia significativa desde el grupo control,  $p < 0.001$  utilizando el Test de Student.

**Tabla 2**

Tratamientos	PLOIDÍAS			Nro células	Nro de embriones	Indice de Metafases
	Mórulas de 72 hs de cultivo					
	% 2n a 4n	% hipoploides	% hiperploides			
Control B	92.7 (206)	2.9 (6)	4.4 (10)	222	20	8 (384)
26µU/ml	93.1 (27)	3.45 (1)	3.45 (1)	29	2	3.26 (184)
52µU/ml	55.55 (15) ***	44.45 (12) ***	0 (0)	27	3	1.5 (66)
104µU/ml	48.34 (73) ***	50.34 (76) ***	1.32 (2)	151	11	0 (193)

\*p< 0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. Análisis de chi cuadrado.

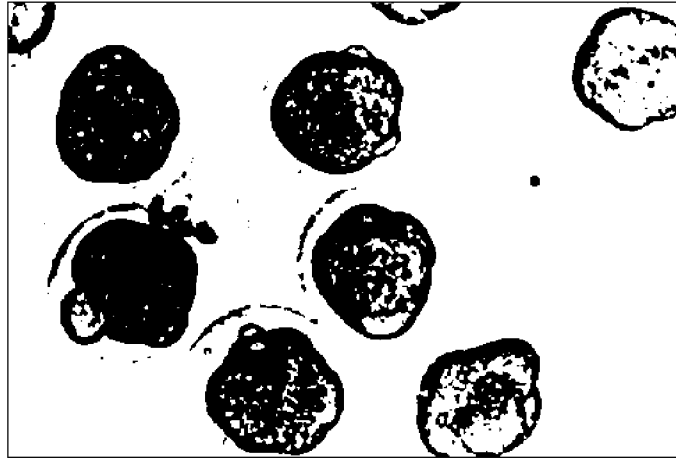
Todos los embriones analizados presentaban CP.

Indice de metafases = 100 x Nro de metafases / Nro de células contadas. No se emplearon drogas para arrestar las células en metafase.

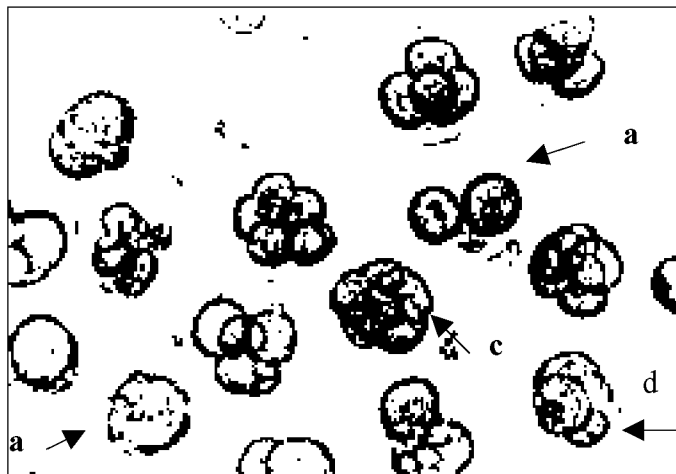
Los valores entre parentesis corresponden al Nro de núcleos medidos.

## FIGURA 1

A

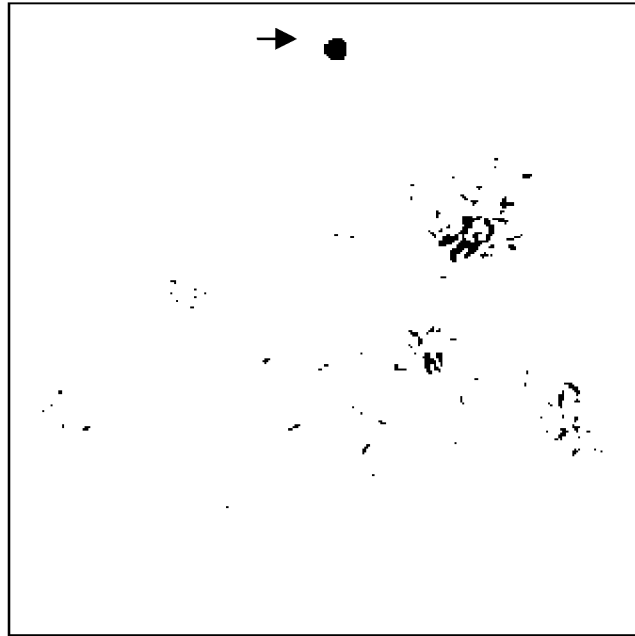


B



**Figura 1.** Desarrollo embrionario comparado control / uranio, a las 72 hs de cultivo: -**A.** Mórula compacta control, sincronía del desarrollo inter e intraembrionario. -**B** Mórulas con asincronías del desarrollo inter e intra embrionarias, compactaciones totales y parciales, cultivadas con 52  $\mu$ U/ml, asimetría del desarrollo: embriones que han detenido su desarrollo (a), mórulas: compacta (b), fragmentada (c), asimétrica (d).

**Figura 2. A.** Mórula compacta control de 22 células, 72 hs de cultivo, tinción de Feulgen - evaluación del contenido de DNA. En la foto se observan células en estadios del ciclo celular. En la parte superior de la foto, se observa el corpúsculo polar n (CP). Magnificación x 700.



**B. En el histograma se observa la distribución de ploidías.**

