

RADIOTONICIDADE E INCORPORAÇÃO DE TIMIDINA-METIL-TRITIA
DA EM EMBRIÕES DE CAMUNDONGO NA FASE DE PRÉ-IMPLANTAÇÃO
CULTIVO E FERTILIZAÇÃO "IN VITRO".

OLIVIA KINIKO KIKUCHI¹, HARUNI ONYAMA² E TAKESHI YAMAMA
DA²

1. IPEN-CNEN/SP DEPTO APLICAÇÕES TÉCNICAS NUCLEARES
2. NATIONAL INSTITUTE OF RADIOLOGICAL SCIENCES, JAPÃO

RESUMO

Timidina-metil-tritiada foi adicionada às microgotas de meio de cultura contendo os zigotos na fase pró-nuclear. Os embriões foram cultivados *in vitro* a 37°C, em uma atmosfera úmida com 5% de CO₂, durante 4 dias até o estágio de blastocisto, que foi usado como parâmetro final para o cálculo da DL₅₀. Estabeleceu-se a taxa de formação dos blastocistos, a DL₅₀ de 2,4x10³Bq/ml a a curva de incorporação da timidina tritiada pelos embriões durante a pré-implantação.

INTRODUÇÃO

O trítio, um radioisótopo emissor de partículas beta é utilizado como marcador de moléculas orgânicas para o estudo de nutrição, metabolismo e fisiologia animal e vegetal, fundamentalmente nas áreas de medicina, agricultura, biologia celular ou molecular e bioquímica. Por outro lado, pode também ser um subproduto liberado ao meio ambiente por reatores nucleares.

O Japão, por possuir vários reatores nucleares geradores de energia elétrica e por estar interessado em continuar a investir nessa área de desenvolvimento, elaborou um plano de pesquisa em fusão nuclear, com duração de dez anos a partir de 1980, a ser desenvolvido nas universidades e institutos japoneses compreendendo as áreas de materiais, trítio, controle de plasma, supercondutividade e projeto de reatores (6). Na área de trítio a principal preocupação foi quanto aos efeitos biológicos do trítio visando a segurança do ser humano e do meio ambiente(6). A Alemanha por sua vez também realizou recentemente um estudo sobre o comportamento do trítio na cadeia alimentar, no qual foi considerado a importância do trítio organicamente ligado para a estimativa de dose(3).

O trítio liberado pelas centrais nucleares ao meio ambiente ocorre em maior quantidade na forma de água tritiada, que então se distribui homogênea nas células de um organismo biológico, mas quando ele se encontra ligado a uma molécula orgânica vai se concentrar onde estiver localizada essa biomolécula. Além disso, a meia-vida biológica do trítio organicamente ligado geralmente apresenta valores mais elevados do que a água tritiada(8), variando conforme o metabolismo da biomolécula tritiada(7). Por outro lado, se o trítio for incorporado em uma posição na qual não ocorre mais troca do hidrogênio, ele permanecerá no organismo até a morte celular, resultando em uma meia-vida biológica bastante longa(3).

A timidina-tritiada, por ser um precursor do DNA, é incorporada pelo material genético da célula e como

consequência podem ocorrer danos causados pela radiação beta do trítio na forma de quebras da cadeia do DNA(1,2).

O sistema embrionário é constituído por células proliferativas que apresentam uma alta taxa de síntese de DNA, sendo portanto um dos sistemas biológicos mais radiosensíveis e de grande interesse para o estudo dos efeitos biológicos das radiações. Segundo Jacquet e Grinfeld(4) não existe variação na sensibilidade de embriões de camundongos irradiados "in vivo" ou "in vitro". Porém, a grande vantagem da fertilização "in vitro" é a garantia de que todos os zigotos se encontram na mesma fase de desenvolvimento e o cultivo "in vitro" permite o acompanhamento do desenvolvimento dos embriões fora do organismo materno. A técnica de fertilização "in vitro" em camundongos foi aperfeiçoada por Yamada e col.(10), cuja eficiência na obtenção de blastocistos chega a superar 95%.

O presente trabalho teve como objetivos obter o valor da DL₅₀ (dose letal 50%) da timidina-metil-tritiada para a formação de blastocistos de embriões de camundongos e a cinética da incorporação do trítio durante o período de pré-implantação do embrião, realizando-se a marcação com o radioisótopo durante a fase pró-nuclear do desenvolvimento do zigoto.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Camundongos fêmeas BC3F1 (C57B1/CSH) com 3-4 meses e machos ICR com 3-6 meses foram mantidos em sala climatizada com um esquema de luminosidade entre 7:00-19:00 horas e alimentados "ad libitum".

Cultura dos embriões: A fertilização e cultura "in vitro" foram realizadas conforme metodologia estabelecida por Yamada e col.(9). As fêmeas foram super-ovuladas com injeções intraperitoneal de hormônios PMS e HCG (Pregnant Mare Serum e Human Chorionic Gonadotropin, respectivamente, da Sankyo Kouki Co. Ltd., Tokyo), 3 dias antes e no dia anterior a fertilização "in vitro", respectivamente. No dia da inseminação um macho foi sacrificado por deslocamento cervical e o esperma, obtido do epidídimo

caudal, foi mantido durante uma hora em meio de fertilização TYH para capacitação, a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As fêmeas super-ovuladas foram sacrificadas em seguida, os ovos retirados da ampola do tubo de Falópio por rompimento e imediatamente imersos em meio TYH. A fertilização "in vitro" foi realizada pipetando-se 5-10 microlitros do meio contendo os espermatozoides sobre as microgotas contendo os ovos e quatro horas após foi feita a seleção dos ovos fertilizados, com sequência de lavagens no meio de cultura M290, reunião dos ovos em um "pool" e divisão final com 20 ovos por microgota do meio de cultura. O desenvolvimento embrionário foi acompanhado durante quatro dias, a 37°C e em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Marcacão com radioisótopo: Timidina-metil-tritiada (74GBq/mol, 37MBq/ml) da Du Pont foi adicionada às microgotas com os zigotos na fase pró-nuclear, seis horas após a inseminação, com concentrações de 3.7×10^2 a 3.7×10^3 Bq/ml (concentração final em 100 microlitros de meio de cultura).

Medida da incorporação do trítio: A taxa de incorporação do trítio foi medida colocando-se 20 embriões sobre papel de filtro, onde foram lavados três vezes com o meio de cultura e oxidados em um aparelho apropriado para então serem contados em líquido cintilador num contador de cintilação Packard.

Cálculo da DL₅₀: A formação de blastocisto expandido foi estabelecida como parâmetro final para o cálculo da DL₅₀, cujos dados foram analisados por transformação probit.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 representa a curva da taxa de formação de blastocistos expandidos, que corresponde ao quarto dia após a marcação, em relação às concentrações do trítio no meio de cultura. A DL₅₀, ou seja, a concentração de radioisótopo requerida para inibir a formação de 50% dos embriões em blastocisto, foi obtida dessa curva, cujo valor encontrado foi de $2,4 \times 10^3$ Bq/ml. Esta concentração é cerca de 1800 vezes mais

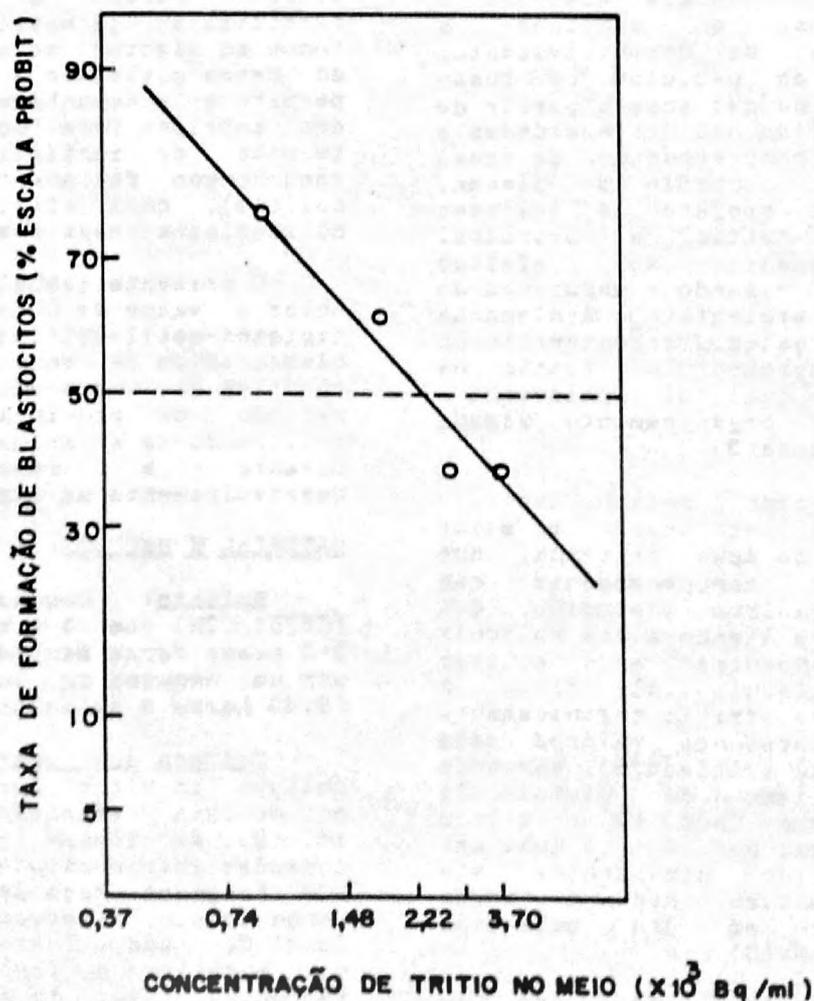


Figura 1 - Determinação da dose letal 50%, DL₅₀, da timidina-metil-tritiada para a formação de blastocistos de embriões de camundongos.

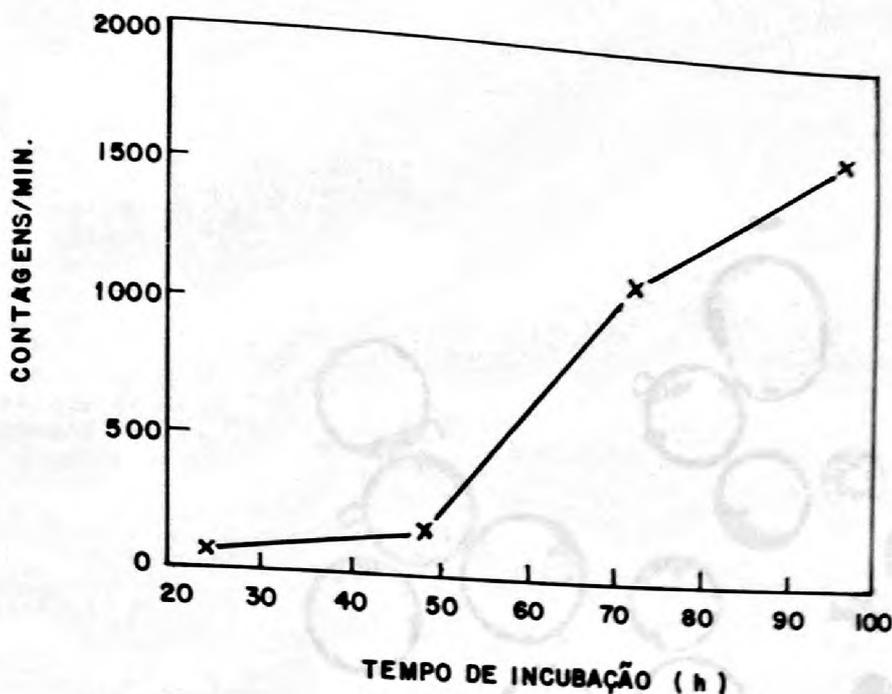


Figura 2 - Incorporação de timidina-metil-tritiada pelos embriões durante o período de pré-implantação.

baixa que o valor da DL₅₀ de $4,7 \times 10^6$ Bq/ml para a água tritiada encontrada por Yamada e col.(9,10), no mesmo sistema embrionário e em condições idênticas quanto a técnica utilizada e a linhagem dos camundongos. De fato, esses autores propuseram que o dano causado pela radiação beta da água tritiada ao DNA é principalmente devido a radiação emitida pelo trítio localizado fora da macromolécula(10), uma vez que a distribuição do trítio neste caso ocorre homogênea dentro da célula. Muller e col.(5) observaram também que ocorre um aumento de 85% no aparecimento de micronúcleos em consequência da incorporação de timidina-metil-tritiada ao DNA de embriões de camundongo, com uma concentração de trítio igual a 925Bq/ml. O tipo de aberração mais frequente causado pelas partículas beta da água tritiada em embriões de camundongo é a do tipo cromossômico, com o aparecimento de fragmentos que são também característicos da radiação gama de cobalto-60 de baixo LET e raios-X(10).

A Figura 2 representa a curva de incorporação da timidina-metil-tritiada durante os quatro dias referentes ao período de pré-implantação do embrião. A concentração do radioisótopo adicionado ao meio de cultura foi igual a $2,4 \times 10^3$ Bq/ml, equivalente ao valor da DL₅₀. Verifica-se que a incorporação da timidina-metil-tritiada pelo embrião é relativamente baixa nos dois primeiros dias, correspondentes a primeira e segunda divisões celulares (72 horas) e blastocisto (96 horas) ocorre um aumento substancial na incorporação.

As observações morfológicas a nível de microscopia óptica efetuadas durante toda a fase de pré-implantação do embrião indicaram que não é possível avaliar os danos da radiação beta do trítio até a formação de mórula. Os efeitos se tornam visíveis só durante a formação do blastocisto, como pode ser observado na Figura 3, evidenciando-se na forma de fragmentação do embrião, aparecimento de bolhas e halos e bloqueio do desenvolvimento na fase de mórula. Estes dados vão ao encontro das observações realizadas por Yamada e col.(9) que obtiveram resultados semelhantes mediante irradiação crônica com água tritiada e radiação gama de cobalto-60.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Japan International Cooperation Agency-JICA.

SUMMARY

Mouse embryos have been used as a good biological system to study the effects of ionizing radiation on proliferating cells and on the mammal embryos development. "In vitro" fertilization is an ideal technique for irradiating or labelling many zygotes at the same developmental stage and with the security that it will not have any influence of maternal organism. In the present work

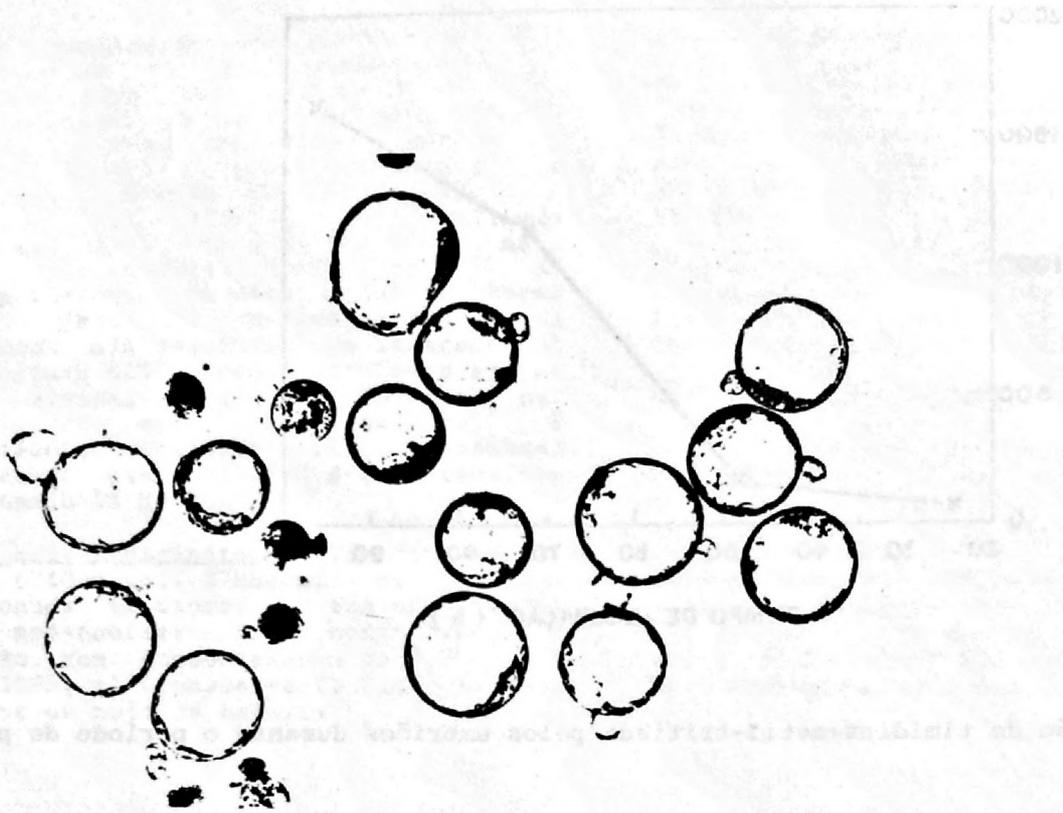


Figura 3A - Desenvolvimento normal dos blastocistos



Figura 3B - Blastocistos anormais de embriões cultivados em meio contendo timidina tritiada

different concentrations of methyl- ^3H -thymidine was added to the culture medium microdrops containing the zygotes at pronuclear stage and the embryos were cultured "in vitro" at 37°C in a humidified atmosphere with 5% of CO_2 for four days up to the expanded blastocyst stage, the established end point to calculate the LD_{50} , the 50% lethal dose. The blastocyst formation rate decreased with increasing concentration of tritium in the medium and a value of 2.4×10^3 Bq/ml for LD_{50} was obtained. The ^3H -TdR incorporation by the embryos during the preimplantation period was low at the beginning and increased quickly during the morula and the blastocyst development.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Burki, H.J.; S.Bunker; M. Ritter; J.E. Cleaver. DNA damage from incorporated radioisotopes: influence of the ^3H location in the cell. Radiat. Res., 62:299-312, 1975.
- [2] Cleaver, J.E.; G.H. Thomas; H.J. Burki. Biological damage from intranuclear tritium: DNA strand break and their repair. Science, 177:996-998, 1972.
- [3] Diabeté, S. and S. Strack. Doses due tritium releases by NET-data base and relevant parameters on biological tritium behaviour. Karlsruhe, Kernforschungszentrum Karlsruhe, GmbH, Dec. 1990. (Kfk-4713).
- [4] Jacquet, P. and S. Grinfeld. Influence of some methodological factors on the radiosensitivity of the mouse zygote. Teratology, 42:453-462, 1990.
- [5] Muller, W.U.; C. Streffer; M. Molls; L. Gluck. Radiotoxicity of ^3H -thymidine and ^3H -arginine in preimplantation mouse embryos "in vitro". Radiat. Prot. Dosim., 16(1-2):155-158, 1986.
- [6] Okada, S., ed.. Tritium radiobiology and health physics: Proc. 3rd Japan-US Workshop, Kyoto, Nov. 8-10, 1988. Nagoya, Institute of Plasma Physics, Mar. 1989. (IPPJ-REV-3).
- [7] Streffer, C. Effects of tritium on the molecular and cellular level. Radiat. Prot. Dosim., 16(1-2):159, 1986.
- [8] Van den Hoek, J. Tritium metabolism in animals. Radiat. Prot. Dosim., 16(1-2):177-121, 1986.
- [9] Yamada, T.; O. Yukawa; K. Asami; T. Nakazawa. Effect of chronic HTO or ^{60}Co radiation on preimplantation mouse development "in vitro". Radiat. Res., 92:359-369, 1982.
- [10] Yamada, T.; Y. Matsuda; H. Ohyama; H. Takiuchi, K. Okuyama. RBE of HTO radiation measured by its effects on cultured mouse embryos at preimplantation stage. Radiat. Prot. Dosim., 16(1-2):151-154, 1986.