



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Influência do azul da Prússia alemão e brasileiro no desenvolvimento "in vitro" de embriões murinos irradiados com cobalto 60 (Co60): uma abordagem reprodutiva e genética

ANDRÉIA RUIS SALGADO

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador:
Prof. Dr. Patrick Jack Spencer

São Paulo
2020



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Influência do azul da Prússia alemão e brasileiro no desenvolvimento "in vitro" de embriões murinos irradiados com cobalto 60 (Co60): uma abordagem reprodutiva e genética

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

ANDRÉIA RUIS SALGADO

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear- Aplicações**

**Orientador:
Prof. Dr. Patrick Jack Spencer**

**São Paulo
2020**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

RUIS SALGADO, A. . ***Influência do azul da Prússia alemão e brasileiro no desenvolvimento "in vitro" de embriões murinos irradiados com cobalto 60 (Co60): uma abordagem reprodutiva e genética.*** 2020. 141 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

<p>Ruis Salgado, Andréia Influência do azul da Prússia alemão e brasileiro no desenvolvimento "in vitro" de embriões murinos irradiados com cobalto 60 (Co60): uma abordagem reprodutiva e genética / Andréia Ruis Salgado; orientador Patrick Jack Spencer. -- São Paulo, 2020. 141 p.</p> <p>Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2020.</p> <p>1. azul da Prússia. 2. embriões "in vitro". 3. implantes intrauterinos. 4. Radiação ionizante. I. Jack Spencer, Patrick, orient. II. Título.</p>
--

Dedico este trabalho à minha família!

Aos meus pais,

Oberlândes Rodrigues Salgado e Lucínda Ruiz Salgado,

por terem me ensinado que o conhecimento é

o único caminho para a liberdade...

Aos meus filhos Lucas e Vitor

pelo apoio, incentivo, carinho,

amor e paciência durante a

realização deste trabalho.

À minha irmã Lucilene, ao cunhado Túlio e a sobrinha Juliana

À minha norinha querida Márcia

Por todo incentivo e amor...

...Obrigada ... Por estarem tão presentes nesse momento!

Amo muito vocês...

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho ao meu amigo...

Luiz Augusto,

Que desde o início sempre confiou em minha capacidade.

*Obrigada pela oportunidade, pelo apoio incondicional,
pela confiança, pelos desafios, pela compreensão e
por toda dedicação em tornar possível a
realização deste trabalho. Tenho em você
um valioso exemplo de profissionalismo,
ética e amor a profissão.*

... minha eterna gratidão e admiração!

AGRADECIMENTOS

... A Deus, por estar presente em minha vida e ser fonte de força, coragem e energia em todos os momentos deste caminho...

Ao meu orientador e amigo, Dr. Patrick Jack Spencer, pela dedicação, orientação, amizade e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador (de coração), Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos, pela sua amizade, pela oportunidade em realizar mais essa etapa da minha vida profissional sempre me incentivando, admiro o seu profissionalismo e competência, exemplo de gentileza e educação, minha eterna gratidão.

À direção do CEMIB, Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos, Dra. Daniele Masselli Rodrigues Demolin e Msc. Marcos Zanfolin pelo apoio, amizade, incentivo e paciência na realização desse trabalho.

Aos amigos Daniele e Marcos sempre presentes e solidários. Obrigada pelo carinho e apoio imprescindível à realização desse trabalho.

Aos amigos do CONSTEC - Armando, Vinicius, Sérgio, Clarice, Cristiane, Edivana, Marcos, Daniele e Augusto, pela participação em momentos importantes à continuidade do trabalho, minha gratidão.

Ao Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Unicamp - CEMIB / UNICAMP.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP.

AGRADECIMENTOS

À Marinha do Brasil, pelo fornecimento do produto e permissão para testá-lo.

Aos meus queridos amigos do LabCrio: Jéssica Maria Inácio, Alex Vinícius de Campos e Robson da Silva Pontes, cuja dedicação, empenho, profissionalismo e segurança transmitida durante este período, foram determinantes para a realização deste trabalho, muito obrigada!!!

Em especial á querida amiga Jéssica Maria Inácio, que me acompanha desde o mestrado, muito obrigada por estar sempre de prontidão para me ajudar!!!

A todos os amigos do laboratório, pela agradável convivência e momentos de descontração em particular para a Alda José Antonio e Sílvio Rogério Cardozo dos Santos por toda colaboração.

À querida Danyella Barbosa Dogini por estar sempre disposta em me ajudar e colaborar, muito obrigada!

Ao meu amigo André Pires Benevides, por ser tão solícito sempre que preciso!

A todos os funcionários do CEMIB que apoiaram a realização deste trabalho, em especial à Ana Paula e Viviane pela amizade e apoio constante.

Às colegas do Controle Sanitário particularmente á Clarice e Josélia, pelo apoio e parceria.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas da Secretaria do CEMIB pela ajuda em vários momentos deste trabalho.

A todos os funcionários e amigos do CEMIB que apoiaram a realização deste trabalho, pelo profissionalismo, amizade e apoio constantes.

A todos os amigos do IPEN, pelos momentos de descontração e agradável convivência em particular para a Ana Cláudia, Cecília, Neide, Mara, André e Calisto por toda colaboração e acolhida.

À Elizabeth Somessarie e ao Carlos Gaia da Siveira, do CTR-IPEN, que foram tão prestativos todas as vezes que precisei para irradiar algum material.

A todos os funcionários da secretaria de Pós-Graduação do IPEN, pela competência e dedicação.

A todos os professores e colegas da pós-graduação do IPEN e UNICAMP, que de diferentes maneiras colaboraram para a viabilização deste trabalho.

*... A todos que me ajudaram e me apoiaram nessa investida,
meus sinceros agradecimentos...*

HOMENAGEM E AGRADECIMENTO

“In memoriam”



Dra. Nanci do Nascimento
Biomédica e cientista nuclear
(02/09/1960 - 13/03/2017)

*“Um professor jamais morre, porque de alguma forma
continua a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver
o mundo pela magia da sua palavra”*

“Rubem Alves”

“A dúvida é o princípio da sabedoria...”

Aristóteles

“Se você pode sonhar, você pode realizar...”

Walt Disney

RESUMO

SALGADO, A.R., **Influência do azul da Prússia brasileiro e alemão no desenvolvimento “*in vitro*” de embriões murinos irradiados com cobalto 60 (Co⁶⁰): uma abordagem reprodutiva e genética.** 2020. 141 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

No mundo moderno é crescente o uso da radiação, o que aumenta as chances de acidentes. O azul da Prússia (AzP) é um composto químico com ação medicamentosa empregado em contaminações com Tálcio, Césio e Rubídio. Com baixa toxicidade, este composto funciona como uma resina de troca iônica, reduzindo a concentração da molécula radioativa que passa a ser excretada mais eficientemente pela urina e pelas fezes. Sua administração em até 10 minutos após a contaminação reduz a sua absorção em até 40%. O Laboratório Farmacêutico da Marinha do Brasil desenvolveu um azul da Prússia nacional, possibilitando a ampliação da pesquisa e uso em nosso país de tecnologias nucleares, uma vez que aumenta significativamente a competência na proteção com o uso deste tipo de energia. Enquanto o azul da Prússia de origem alemã pôde ser empregado em acidentes como o de Goiânia e o de Chernobyl, o medicamento nacional ainda carece de alguns estudos para uso endógeno com segurança. Além disso, tanto o produto alemão quanto o brasileiro foram pouco investigados do ponto de vista da reprodução em seus diferentes vieses. A avaliação da interferência do azul da Prússia na reprodução, considerando-se o desenvolvimento embrionário e a sua capacidade de proteger embriões expostos à radiação é inédita. Também é bastante escassa a literatura que trata da investigação deste fármaco quanto aos aspectos reprodutivos, quer seja do ponto de vista de sua toxicidade para os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (fase de pré-implantação), quer seja nos casos de prenhes, situação em que muito pouco se conhece sobre a influência do azul da Prússia. O estudo visou avaliar a influência do AzP em diferentes etapas da reprodução em camundongos, comparando o produto alemão com o nacional. Os ensaios *in vitro*, com embriões indicaram que

os compostos têm baixa toxicidade. De forma inesperada, o composto, desenhado para tratar contaminação interna, demonstrou ação também contra radiação de fonte externa, protegendo contra raios gama de ⁶⁰Co. Embriões tratados com os compostos, irradiados ou não e implantados em fêmeas receptoras, indicaram que o AzP não afetou a viabilidade dos embriões, não impediu a gestação e o parto, não interferiu nos parâmetros zootécnicos tais como, primeiro parto em semanas e tamanho médio da ninhada tampouco apresentou efeito teratogênico. Indicando seu possível uso em gestantes no caso de um acidente nuclear. Este estudo contribuirá para que o produto desenvolvido com tecnologia brasileira possa ser comparado com o composto em uso em todo

o mundo, posicionando o Brasil como líder na produção deste composto na América Latina.

Keywords: azul da Prússia, embriões *“in vitro”*, implantes intrauterinos, radiação ionizante.

ABSTRACT

SALGADO, A.R., ***Influence of Brazilian and German Prussian blue on "in vitro" development of murine embryos irradiated with cobalt 60 (⁶⁰Co): a reproductive and genetic approach.*** 2020. 141 p. Thesis (PhD in Nuclear Technology) - Energy and Nuclear Research Institute - IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

In the modern world, the use of radiation is growing, increasing the chances of accidents. Prussian blue (PB) is a chemical compound with medicinal action used in contaminations with Thallium, Cesium and Rubidium. With low toxicity, this compound works as an ion exchange resin, reducing the concentration of the radionuclid that is excreted more efficiently by urine and feces. Its administration within 10 minutes after contamination, reduces its absorption by up to 40%. The Brazilian Navy Pharmaceutical Laboratory has developed a national Prussian blue, enabling the expansion of research and use of nuclear technologies in our country, since it significantly increases the competence in protection with the use of this type of energy. While the Prussian blue of German origin could be used in accidents such as Goiania and Chernobyl, the national compound still lacks some studies for safe endogenous use. In addition, both the German and the Brazilian product were little investigated from the point of view of reproduction in their different biases. The evaluation of the interference of Prussian blue in reproduction, considering the embryonic development and its ability to protect embryos exposed to radiation is unprecedented. There is also very little literature on the research of this drug with regard to reproductive aspects, either from the point of view of its toxicity to the early stages of embryonic development (pre-implantation phase) or in the case of pregnant females, where very little is known about the influence of Prussian blue. The study aimed to assess the influence of PB at different stages of reproduction in mice by comparing the German product with the national product. *In vitro* assays with embryos indicated that both compounds had low toxicity. Unexpectedly, the compound, designed to treat internal contamination, also displayed effectiveness against external radiation, protecting embryos against ⁶⁰Co gamma rays. Prussian blue treated embryos, submitted or not to gamma rays, implanted in recipient females, showed that the compound did not affect the embryos viability, pregnancy and birth and did not interfere with zootechnical parameters such as time for first delivery and average litter size. This study will contribute to the product developed with Brazilian technology being compared with the compound in use all over the world, positioning Brazil as the leading producer of this compound in Latin America.

Keywords: Prussia blue, *in vitro* embryos, intrauterine implants, ionizing radiation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. O ESTADO DA ARTE.....	25
2.1 Radiações ionizantes.....	26
2.2 Compostos radiomodificadores.....	27
2.2.1 Radiossensibilizadores.....	27
2.2.2 Radioprotetores.....	28
2.2.3 Principais eventos relacionados com a pesquisa dos radioprotetores.....	29
2.3 Acidentes radioativos.....	31
2.3.1 Acidente de Chernobyl – Ucrânia.....	31
2.3.2 Acidente de Goiânia – Brasil.....	32
2.4 Azul da Prússia.....	34
2.4.1 A fabricação do azul da Prússia pelo Laboratório Farmacêutico da Marinha (LFM).....	38
2.5 Toxicologia do céσιο.....	39
2.6 Toxicologia do tálio.....	40
2.7 O Cultivo de embriões.....	42
2.7.1 Meios de cultivo e condições adequadas para o desenvolvimento embrionário.....	42
2.7.2 Embriotoxicidade.....	44
2.7.3 Desenvolvimento embrionário inicial.....	45
3. OBJETIVOS.....	51
3.1 Objetivo geral.....	51
3.2 Objetivos específicos.....	51
4. METODOLOGIA.....	53
4.1 Animais utilizados.....	54
4.2 Manutenção dos animais.....	54
4.3 Características reprodutivas das linhagens utilizadas nos experimentos (C57BL/6J, C3H/HePAS e B6C3H-F1).....	55
4.4 Delineamento experimental.....	56
4.5 Meios de cultivo e de coleta de embriões.....	59
4.6 Coleta dos embriões.....	59
4.7 Machos vasectomizados.....	61
4.8 Preparo das fêmeas receptoras pseudoprenhas.....	62
4.9 Implante de embriões ou transferência embrionária.....	62
4.10 Azul da Prússia (AzP).....	63
4.10.1 Diluições do Azul da Prússia (AzP).....	63
4.11 Radiações.....	64
4.12 Experimentos realizados <i>in vitro</i>.....	64
4.12.1 Influência do azul da Prússia (AzP) sobre o desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	65
4.12.2 Influência da radiação ionizante sobre o meio de cultivo M16 no desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	66
4.12.3 Influência da radiação sobre o azul da Prússia impactando no desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	67
4.12.4 Influência da radiação sobre o embrião e o seu desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	67
4.12.5 Influência da concentração do azul da Prússia na irradiação dos embriões.....	68
4.13 Experimentos <i>in vivo</i> (Implantes embrionários).....	69
4.13.1 Implante de embriões irradiados e não irradiados, na presença e na ausência de azul da Prússia, em fêmeas receptoras pseudoprenhas.....	70
4.13.2 Acasalamentos realizados com as progênies originadas dos implantes de embriões.....	71
4.14 Análise estatística.....	71

SUMÁRIO

5. RESULTADOS	72
5.1 Experimentos <i>in vitro</i>	73
5.1.1 Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....	73
5.1.2 Influência do azul da Prússia (AzP) no desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	73
5.1.3 Influência da radiação ionizante sobre o meio de cultivo M16 no desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	79
5.1.4 Influência da radiação sobre o azul da Prússia impactando no desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	81
5.1.5 Influência da radiação sobre o embrião e o seu desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	82
5.1.6 Influência do azul da Prússia em diferentes concentrações e doses de irradiação.....	84
5.2 In vivo – Implante embrionário	86
5.2.1 Implante de embriões desenvolvidos na presença do azul da Prússia em fêmeas receptoras pseudoprenhes.....	87
5.2.2 Implante de embriões irradiados com 1,5 mg de azul da Prússia (AzP) em fêmeas receptoras pseudoprenhes.....	88
5.2.3 Implante de embriões irradiados com 1 Gy e 1,5 Gy em fêmeas receptoras pseudoprenhes.....	90
5.2.4 Acasalamentos realizados com as progênie originadas dos implantes de embriões.....	92
5.2.5 Resultados dos acasalamentos realizados com as progênie originadas dos implantes de embriões do grupo controle (cultivo em meio M16 sem AzP).....	93
5.2.6 Resultados dos acasalamentos realizados com as progênie originadas dos implantes de embriões cultivados na presença do azul da Prússia Brasileiro e Alemão.....	94
5.2.7 Resultados dos acasalamentos realizados com as progênie originadas dos implantes de embriões irradiados na presença de AzP brasileiro e alemão.....	95
5.2.8 Resultados dos acasalamentos realizados com as progênie originadas dos implantes de embriões irradiados com 1 e 1,5 Gy.....	97
5.2.8.1 Resultados dos acasalamentos realizados com as progênie originadas dos implantes de embriões irradiados com 1,5 Gy.....	98
5.2.8.2 Resultados dos acasalamentos realizados com as progênie originadas dos implantes de embriões irradiados com 1 Gy.....	99
5.2.8.3 Resultados do retroacasamento das fêmeas com anoftalmia nascidas da irradiação com 1 Gy e 1,5 Gy e seu filho macho de primeira geração.....	102
5.2.8.4 Resultados observados até a 3º geração dos dados reprodutivos e das alterações fenotípicas observados nas progênie dos acasalamentos de: embriões cultivados com AzP brasileiro e alemão; embriões irradiados na presença do AzP brasileiro e alemão; embriões irradiados sem AzP...	103
6. DISCUSSÃO	104
7. CONCLUSÃO	119
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
9. ANEXOS	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Poder de penetração das radiações.....	27
Figura 2:	Azul da Prússia.....	34
Figura 3:	Representation of the 2 D Chemical Structure of Prussian Blue.....	35
Figura 4:	Radiogardase® - azul da Prússia Alemão.....	37
Figura 5:	Azul da Prússia Brasileiro do LFM.....	39
Figura 6:	Visão geral do desenvolvimento do camundongo. O desenvolvimento embrionário do camundongo leva aproximadamente 19 dias. As fases pré e pós-implantação são indicadas acima da linha do tempo, eventos e processos críticos são indicados abaixo da linha do tempo.....	46
Figura 7:	Apresentação esquemática do desenvolvimento do pré-implante de camundongo; A fertilização ocorre na parte próxima ao oviduto, os zigotos sofrem clivagem enquanto migram em direção ao útero; A compactação ocorre no estágio de oito células, para a formação do blastocisto, 3,5 dias, no útero; Quando o blastocisto eclode, ocorre a implantação da massa celular interna (MCI); ectoderme primitivo (pec); endoderme primitivo (pen); trofotoderma (TE); trofotoderma polar (pTE); trofotoderma mural (mTE)...	49
Figura 8:	Diferentes estágios de desenvolvimento do camundongo	50
Figura 9:	Fluxograma geral do delineamento experimental	58
Figura 10:	Tampão vaginal formado após a cópula	60
Figura 11:	Coleta de embriões por <i>flushing</i> (oviduto com agulha na entrada do infundíbulo).....	61
Figura 12:	Fonte de ⁶⁰ Cobalto - Gammacell 220 no SERD-IPEN-CNEN.....	64
Figura 13:	Desenvolvimento embrionário.....	66
Figura 14:	Palhetas ou <i>straws</i> (para congelamento de embriões).....	68
Figura 15:	Curvas dose-resposta comparando o azul da Prússia (AzP) alemão e o brasileiro.....	75
Figura 16:	Embriões cultivados na presença de AzP Alemão e Brasileiro.....	76
Figura 17:	Azul da Prússia Alemão (em cima) e Brasileiro (em baixo).....	78
Figura 18:	Embriões desenvolvidos no AzP Brasileiro (Blastocistos).....	78
Figura 19:	Embriões desenvolvidos no AzP Alemão (Blastocistos).....	78
Figura 20:	Curvas dose-resposta do meio de cultivo M16 influenciando na formação de blastocistos.....	80
Figura 21:	Curvas dose-resposta do efeito da radiação nos embriões.....	83
Figura 22:	Embriões irradiados na presença e na ausência do AzP.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 23: Relação de número de partos e filhotes nascidos, dos blastocistos (embriões) implantados na presença de AzP brasileiro e alemão.....	88
Figura 24: Número de partos e filhotes nascidos de embriões (irradiados na presença de AzP alemão e brasileiro) que desenvolveram até blastocistos, e foram implantados em fêmeas receptoras pseudoprenhes.	90
Figura 25: Anoftalmia em fêmeas nascidas de implantes de embriões irradiados com 1 Gy e 1,5 Gy.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Parâmetros reprodutivos das linhagens C57BL/6J, C3H/HePAS e B6C3H-F1.....	56
Tabela 2:	Quantidade total de animais utilizados nos experimentos e a quantidade de embriões obtidos.....	56
Tabela 3:	Número de fêmeas (doadoras e receptoras) e média de embriões coletados por experimento.....	57
Tabela 4:	Quantidades de fêmeas doadoras e receptoras por grupo de implante.....	70
Tabela 5:	Influência do azul da Prússia (AzP) sobre o desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	74
Tabela 6:	Embriões cultivados com 1,5 mg do AzP Alemão e o controle (0 mg).....	75
Tabela 7:	Embriões cultivados com 1,5 mg do AzP Brasileiro e o controle (0 mg).....	76
Tabela 8:	Comparação do AzP Alemão e Brasileiro no cultivo de embriões.....	76
Tabela 9:	Influência da radiação ionizante sobre o meio de cultivo M16.....	79
Tabela 10:	Influência da radiação sobre o azul da Prússia.....	81
Tabela 11:	Efeito da radiação sobre o embrião e seu desenvolvimento <i>in vitro</i>	82
Tabela 12:	Embriões Irrradiados com 1 e 1,5 Gy.....	83
Tabela 13:	Concentrações de AzP brasileiro e alemão e diferentes doses de irradiação.....	84
Tabela 14:	Embriões irradiados com 1,5 Gy na presença e na ausência do AzP.....	85
Tabela 15:	Implantes de embriões no estágio de blastocistos, desenvolvidos na presença de AzP brasileiro e alemão 1,5 mg, em fêmeas receptoras pseudoprenhes e implantes do grupo controle, embriões desenvolvidos sem AzP.....	87
Tabela 16:	Implantes de blastocistos em fêmeas receptoras pseudoprenhes (embriões de 02 células, que foram irradiados (1,5 Gy) na presença de AzP (1,5 mg de brasileiro e alemão) e implantes do grupo controle, embriões desenvolvidos em meio M16.....	89
Tabela 17:	Quantidades de implantes realizados em fêmeas receptoras pseudoprenhes, com embriões irradiados e desenvolvidos até blastocistos.....	91
Tabela 18:	Casal acompanhado até a terceira geração, grupo controle (embriões cultivados sem tratamento).....	93
Tabela 19:	Casal acompanhado até a terceira geração (embriões cultivados na presença de azul da Prússia Brasileiro).....	94
Tabela 20:	Casal acompanhado até a terceira geração (embriões cultivados na presença de azul da Prússia Alemão).....	95
Tabela 21:	Casal acompanhado até a terceira geração (embriões irradiados na presença de azul da Prússia Brasileiro).....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 22:	Casal acompanhado até a terceira geração (embriões irradiados na presença de azul da Prússia Alemão).....	97
Tabela 23:	Casal formado por embriões irradiados: ♂ fenótipo normal x ♀ fenótipo com anofthalmia (1,5 Gy). Descendentes acompanhados até a terceira geração.....	98
Tabela 24:	Casal: ♂ <u>não</u> irradiado X ♀ irradiada com 1,5 Gy, acompanhado até a terceira geração.....	99
Tabela 25:	Casal: ♂ irradiado X ♀ irradiada com anofthalmia (1 Gy), acompanhado até a terceira geração.....	100
Tabela 26:	Casal: ♂ <u>não</u> irradiado X ♀ irradiada com 1 Gy, acompanhado até a terceira geração.....	101
Tabela 27:	Casal: ♂ irradiado com 1 Gy X ♀ <u>não</u> irradiada, acompanhado até a terceira geração.....	102
Tabela 28:	Dados reprodutivos e alterações fenotípicas dos grupos acima, acompanhados até a terceira geração.....	103

LISTA DE ABREVIÇÕES E/OU SIGLAS

AzP	Azul da Prússia
CAS	Chemical Abstracts Service
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
Cs-137	Césio 137
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dpc	Dia pós-coito
<i>FDA</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
Gy	Gray
HCM	Hospital Central da Marinha
IND	Investigational New Drug
INES	Escala Internacional de Acidentes Nucleares
IRD	Instituto de Radioproteção e Dosimetria
LFM	Laboratório Farmacêutico da Marinha
LH	Hormônio luteinizante
MCI	Massa celular interna
mTE	Trofectoderma mural
PB	<i>Prussian Blue</i>
PBNPs	Nanopartículas de azul da Prússia
pec	Ectoderme primitivo
pen	Endoderme primitivo
PMSG	<i>Pregnant mare serum gonadotropin</i>
pTE	Trofectoderma polar
REAC/TS	Radiation Emergency Assistance Center/Training Site
TE	Trofectoderma
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida de radiação
UI	Unidade internacional
ZP	Zona pelúcida

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A matriz energética de nosso planeta é finita e está se esgotando rapidamente. Neste contexto, o uso da radiação como fonte de energia assume uma importância vital.

Não obstante este fato, radiação ionizante está presente em muitos outros aspectos de nossa vida, tais como tratamentos médicos, exames de imagens não invasivos ou mesmo como fonte de energia para cidades e para transporte de veículo militar.

Desta forma, a despeito dos inúmeros benefícios que a energia gerada com a radiação proporciona na atualidade, ela também oferece riscos que não podem ser negligenciados (PLOKHY, 2018).

Se por um lado esta tecnologia contribui com a qualidade de vida das pessoas, oferecendo a possibilidade de se realizar diagnósticos por imagens e implementar tratamentos oncológicos, por outro ela mostra a sua pior face nos acidentes como os observados na União Soviética, na Ásia e mesmo no Brasil (TANJI, 2016; VEJA, 2016).

O acidente radioativo de Chernobyl, por exemplo, revelou ao mundo que apesar dos sistemas de segurança instalados, o poder de reação do homem frente a um evento como aquele é muito reduzido. Além de alcançar pessoas que moravam próximo à usina, a poeira radioativa se dissipou e atingiu outras regiões da Europa. Infelizmente, o fato é que em um primeiro momento, é o contato direto com a radiação que será prejudicial à saúde, mas uma vez no ar, a partícula radioativa se dissipará e poderá cair sobre produtos que serão consumidos na forma de alimentos, ou mesmo na água (IEA,1997; CHEN et al., 2015; RIFE, 2017).

Da mesma forma, após o acidente na Central Nuclear de Fukushima em 11 de março de 2011, quando 3 dos 6 reatores sofreram derretimento, houve uma grande preocupação com a poeira radioativa, o que estimulou o uso do azul da Prússia e de Zeólita para a descontaminação da região de Fukushima (PARAJULI *et al*, 2016). Contudo, infelizmente os danos originados em um acidente como o de Chernobyl não se restringem ao meio ambiente e nem são rapidamente resolvidos, podendo ser sentidos em médio e longo prazos e tanto localmente quanto em regiões distantes.

Atribui-se à poeira radioativa gerada em Chernobyl a grande quantidade de cânceres de tireóide que se observou no norte da França nos anos seguintes ao acidente da União Soviética (CHAMPION *et al*, 2002).

Outro efeito foi observado em pessoas nascidas após o desastre quando problemas no DNA foram relatados. Na ocasião cientistas se mostram especialmente preocupados com os casos de instabilidade por microssatélites, quando o DNA tem a sua capacidade de reparo e replicação comprometida. Esta situação foi detectada em crianças cujos pais foram expostos à radiação após o desastre (PLOKHY, 2018). Em nosso país, não fossem as questões técnicas inerentes ao uso da radiação por si só arriscadas, também não se pode descartar o risco de acidentes como o ocorrido em Goiânia em 13 de setembro de 1987, quando a radiação levou à morte imediata quatro pessoas e outras duas posteriormente.

Neste acidente, ainda que absolutamente evitável, ele demonstrou que populações vulneráveis podem ser expostas de diferentes maneiras a um produto radioativo e ressaltou que a possibilidade de se poder contar com substâncias que ofereçam alguma proteção ou uma oportunidade de tratamento, como o azul da Prússia, é essencial (ARNALDO & MEDEIROS, 1988).

O acidente de Goiânia foi classificado na “Escala Internacional de Acidentes Nucleares” como gravidade cinco, duas apenas abaixo da máxima.

Embora existam situações em que o contato com a radiação é inevitável e imprevisível (como nos casos de acidentes), há outras em que os profissionais estão cientes de que entrarão em contato com ela e para estes casos devem ser adotadas todas as medidas de proteção possíveis. Diversas medidas podem ser empregadas tais como escudos de proteção e vestimenta específica, porém, estas providências são para evitar que a radiação e o produto radioativo alcancem o indivíduo. Contudo, caso esta blindagem falhe, o profissional poderá ficar exposto a riscos e não há, até o momento, estudos demonstrando ser ou não efetivo um tratamento prévio e profilático com alguma droga como o azul da Prússia, a fim de que haja um incremento à proteção do indivíduo.

O azul da Prússia é um composto empregado em contaminações com tálio e céσιο. Com baixa toxicidade, este medicamento funciona como uma resina de troca iônica e reduz a concentração dos íons radioativos de céσιο e tálio que passam a serem excretados mais eficientemente pelas fezes. Quando

administrado rapidamente reduz a absorção da radiação em até 40%. O produto comercial atualmente em uso em todo o mundo é comercializado com o nome de Radiogardase®. O primeiro fabricante deste medicamento foi a Heylchem. Pharm. Fabrik e atualmente o composto é produzido pela farmacêutica Haupt Pharma Berlin GmbH, ambas com sede em Berlin na Alemanha.

Contudo, a despeito desta importância para vítimas da radiação e como um suporte no tratamento de áreas contaminadas por material radioativo, muito pouco se conhece sobre as consequências do AzP na reprodução, em especial nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário (Radiogardase-Cs, 2015). O embrião de mamíferos é um organismo sofisticado, complexo e exigente quanto às condições do meio em que ele é colocado para se desenvolver. É, portanto, um desafio do ponto de vista técnico, pois os meios são equilibrados e pequenas alterações na sua composição inviabilizarão o cultivo. Desta forma, somente condições muito bem definidas e estáveis permitirão aos embriões se dividirem e alcançarem o estágio de blastocisto. Assim, quando pequenas mudanças acontecem, elas comprometem definitivamente o embrião, que não se desenvolve, se fragmenta ou degenera (WHITTEN, 1956; 1968).

A Marinha do Brasil, por meio de seu Laboratório Farmacêutico, desenvolveu um produto nacional, possibilitando ampliar a pesquisa e uso em nosso país, de tecnologias nucleares uma vez que aumenta, significativamente, a competência na proteção ao uso deste tipo de energia. Enquanto o azul da Prússia de origem alemã pode ser empregado em acidentes como o de Goiânia e o de Chernobyl entre outros, o medicamento nacional ainda carece de alguns estudos para uso endógeno com segurança. Além disso, tanto o produto alemão quanto o nacional foram muito pouco investigados do ponto de vista da reprodução em seus diferentes vieses.

2. O ESTADO DA ARTE

2. O ESTADO DA ARTE

2.1 Radiações ionizantes

A radiação ionizante se caracteriza por ondas eletromagnéticas com energia suficiente para promover o desprendimento dos elétrons de átomos e moléculas. Este processo é conhecido como “ionização” e acaba por alterar a estrutura original dos compostos irradiados, tornando-os eletricamente carregados (INCA, 2019).

Existem diversos tipos de radiação ionizante, sendo as mais conhecidas os raios x. Os raios x são ondas eletromagnéticas de alta energia derivadas de transições eletrônicas do átomo que ficou excitado ou ionizado após a interação. São largamente utilizados em equipamento médico radiológico, normalmente para diagnóstico. Neste caso, elétrons das camadas externas fazem transições para ocupar lacunas produzidas pelas radiações nas camadas internas, próximas do núcleo, emitindo o excesso de energia sob a forma de raios x (TAUHATA, *at al.*, 2014; INCA, 2019).

Não obstante os raios x, outros tipos de radiações ionizantes podem ser produzidas por núcleos de átomos instáveis, tais como a alfa (α), a beta (β) e a gama (γ) (Figura: 1).

A radiação alfa é constituída por 02 prótons e 02 nêutrons, possui carga positiva e uma massa e carga elétrica maior que as demais radiações. Trata-se de uma radiação muito energética (NAGAI, 2019; INCA, 2019).

A radiação gama por outro lado não é menos energética; é isenta de carga e extremamente penetrante. É altamente nociva à saúde humana quando empregada de maneira errada, podendo causar prejuízos às células em especial ao seu DNA (INCA, 2019).

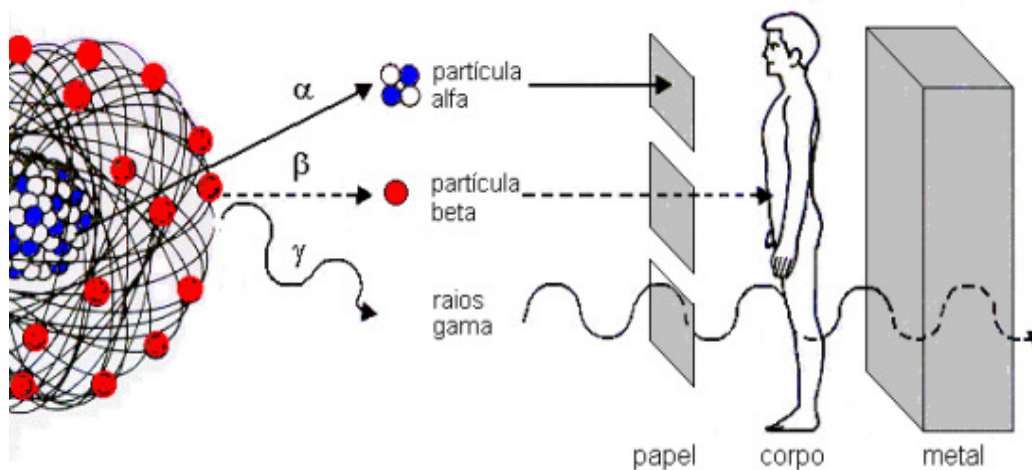


Figura1: Poder de penetração das radiações

Fonte: lpen.br

2.2 Compostos radiomodificadores

Os radiomodificadores são substâncias que tem a propriedade de alterar a sensibilidade à radiação. São divididos em dois grupos a saber: os radiosensibilizadores e os radioprotetores.

2.2.1 Radiossensibilizadores

Trata-se de moléculas empregadas em conjunto com a radiação, no tratamento de tumores. São conhecidos como compostos radiomodificadores e radiosensibilizadores e decorrem da descoberta, no princípio do século passado, de que tecidos irradiados na ausência de Oxigênio (O_2) apresentavam uma resistência de 2,5 a 3 vezes maior que tecidos irradiados na presença deste gás. Como consequência, pesquisadores iniciaram a busca por protocolos que pudessem ser úteis no tratamento de tumores e em meados da década de 1950, foi apresentado o primeiro modelo de hipóxia em tumores (BUMP, 1983).

São, portanto, de grande importância na área médica onde estão cada vez mais sendo utilizados para o tratamento de tumores. Devido ao fato de, uma vez presente no momento da irradiação potencializar os efeitos desta, conferem maiores danos à massa celular tumoral, aumentando as chances de cura.

Compostos Nitro-heterocíclicos, especialmente os nitroimidazóis e os complexos de ródio (carboxilato de Rh II como acetato, propionato e butirato), apresentam boa atividade como radiosensibilizadores (NEGRÓN, 2005).

No caso dos complexos de ródio, o principal interesse reside no fato de estudos *in vitro* com células de hamster, demonstrarem que sua afinidade é maior pelos complexos celulares que contém enxofre, um elemento importante nos efeitos da radiação.

Contudo, enquanto experimentalmente células de mamíferos são testadas *in vitro* com altas doses de radiação (6 a 36 Gy), do ponto de vista clínico na radioterapia empregam-se, a cada semana, doses bastante menores (1 a 3 Gy), razão pela qual torna-se importante o uso de substâncias capazes de aumentar a eficiência da radiação empregada com fins terapêuticos (BUMP, 1983).

Outro composto descoberto na década de 1970 foi o Misonidazole (MIS).

Esta droga se mostrou muito promissora a princípio, pois, testes realizados com animais tiveram bons resultados, na afinidade pelo tumor. Contudo o composto original teve graves efeitos colaterais tais como distúrbios neurológicos e toxicidade elevada.

Todavia, em razão das boas perspectivas do Misonidazole, tais como a sua excelente ligação a tumores e a sua boa eletro afinidade, o composto sofreu modificações que diminuiram a sua toxicidade mantendo a mesma radiosensibilidade (NEGRÓN, 2005).

Atualmente outros quimiossensibilizadores são utilizados, como a ciclofosfamida, o Melphalan (L-PAM) e o Benzonidazol, todos com ações efetivas em diferentes condições de irradiação.

Um segundo grupo de radiomodificadores são os radioprotetores.

2.2.2 Radioprotetores

Embora como observado acima, existam compostos que, quando associados à radiação oferecem excelentes resultados no combate a tumores, muitas vezes o que se deseja é reduzir os efeitos nocivos da radiação ionizante no organismo. Nestes casos emprega-se uma segunda classe de substâncias modificadoras da radiação que são os radioprotetores.

Os agentes radioprotetores podem ser sintéticos ou naturais e são, via de regra, administrados antes da irradiação com a finalidade de reduzir os danos decorrentes da exposição (ANDRADE, 2012).

Compostos com ação radioprotetora devem: demonstrar ter uma proteção significativa contra os efeitos da radiação; atuar evitando danos ao maior número de órgãos e tecidos e não serem tóxicos ou apresentar baixa toxicidade. Também não devem se acumular e produzir danos irreversíveis. Os compostos radioprotetores devem conferir um longo período de proteção, serem estáveis em um período de armazenamento de 2 a 5 anos em condições normais ou mesmo adversas e devem poder ser administrados com outras drogas, além de serem bem tolerados e não interferir com o comportamento.

Atualmente exige-se que o composto promova uma redução do efeito da radiação, por um fator de dois pelo menos, além de apresentar via de administração de fácil aceitação sendo preferencialmente oral (IPEN, 2014).

Compostos radioprotetores assumem maior importância nos dias de hoje, em razão de suas aplicações militares onde é cada vez maior o risco de atentados terroristas. Contudo, não obstante este uso, surgem ocasiões em que o contato com a radiação é inevitável, como nos casos de limpeza de áreas com acidentes radioativos (OKUNO,2013).

2.2.3 Principais eventos relacionados com a pesquisa dos radioprotetores

Os primeiros experimentos relacionados a um composto radioprotetor, foram realizados nos anos 1950 empregando cisteína em doses elevadas que eram administradas a ratos expostos a doses letais de raios x. A proteção conferida aos animais, comprovada por meio da elevada sobrevivência, demonstrou ser a molécula efetiva na proteção aos animais.

Nas décadas seguintes, entre 1957 e 1973, mais de 4.400 compostos foram investigados e desenvolvidos, sendo a maioria derivada de aminotióis. Foi neste período que foi descoberta a WR2721 também conhecida como amifostina, um composto com ação citoprotetora muito utilizado em pacientes com câncer que são submetidos a tratamentos. A ação deste fármaco visa proteger os tecidos sadios durante um tratamento oncológico (SOUZA, 2000; SHAW, 1988).

Outra molécula importante, devido à sua ação radioprotetora para tratamento clínico, é a enzima SOD ou superóxido dismutase. Esta enzima acelera o processo de dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A enzima, que tem produção endógena, nos casos em que há um tratamento oncológico em curso, precisa ser suplementada com o objetivo de reduzir a presença e os efeitos prejudiciais oriundos dos radicais livres.

São encontradas duas versões da superóxido dismutase, a produzida pela indústria farmacêutica (ex. ZIRVIT) e a de origem animal, extraída do fígado de bois e administrada a pacientes que apresentam necrose decorrente da irradiação (FREITAS, 2010).

A radiação ionizante empregada nos protocolos de tratamento oncológicos, provoca a radiólise da água existente no interior das células e conduz à formação de substâncias tóxicas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de radicais livres como o $\bullet OH$. A elevada reatividade destas moléculas provoca danos ao DNA e às células dos organismos (NOUAILHETAS *et. al.*, 2008).

Os radicais livres possuem um ou mais elétrons livres em sua órbita externa. Podem ser átomos, moléculas ou íons e apesar de terem uma meia vida curta, apresentam grande capacidade reativa, uma vez que captam um elétron de compostos próximos para se estabilizarem, independentemente de sua natureza, ou seja, dele ser uma molécula, célula ou um tecido do organismo. Esta elevada reatividade conduz, via de regra, a uma reação em cadeia de lesão celular (NAGAI, 2019).

Desta forma, embora exista normalmente uma produção endógena de radicais livres como subproduto do metabolismo celular, a sua concentração no organismo pode aumentar significativamente em razão de fatores externos entre os quais está a radiação ionizante. Muitos tipos de cânceres se originam a partir da ação de radicais livres sobre o DNA, resultando em mutações que afetam o ciclo celular e a conduzem, muitas vezes, a uma malignidade.

O aumento na concentração de O_2 no ambiente celular amplia a sensibilidade aos efeitos da radiação. Desta forma, compostos radioprotetores induzem a uma hipóxia ao mesmo tempo em que consomem o oxigênio presente no meio intracelular, dificultando a formação de espécies reativas que dependem de oxigênio e a formação de peróxido de hidrogênio. Uma categoria de substâncias que têm estas características são os aminotióis, que por

apresentarem este mecanismo de ação, são muito efetivos na redução da letalidade induzida pela radiação (AZEVEDO, 2004).

Entre os compostos mais utilizados para a radioproteção está o azul da Prússia, um produto cada vez mais importante nos dias atuais em razão do crescente emprego da radiação ionizante nas mais diversas áreas.

2.3 Acidentes radioativos

A partir da descoberta da radiação, várias aplicações têm sido estimuladas, indo desde o seu uso para o tratamento de cânceres até para a geração de energia e para finalidades militares.

Desta forma, a despeito dos benefícios que se pretende alcançar, estão sempre presentes também, os riscos de acidentes.

A ocorrência de eventos assim é sempre muito séria, com danos relevantes para as pessoas e para o meio ambiente.

Os cinco maiores acidentes envolvendo radiação foram, *Kyshtym Daiichi* em 1957 na União Soviética; *Windscale* em 1957 no Reino Unido; *Three Mile Island* nos Estados Unidos em 1979; Chernobyl na União Soviética em 1986 e Fukushima no Japão em 2011.

Destes acontecimentos, os classificados como mais graves na Escala Internacional de Acidentes Nucleares (INES), foram Chernobyl e Fukushima, ambos com sete pontos de gravidade. Contudo, em razão da extensão dos danos ao meio ambiente e pela amplitude no espalhamento da poeira radioativa que se formou, o acidente de Chernobyl é o mais relevante.

2.3.1 Acidente de Chernobyl - Ucrânia

O maior desastre nuclear da história ocorreu em Chernobyl, na região da Ucrânia, em 26 de abril de 1986, quando um reator da usina apresentou problemas técnicos, liberando uma nuvem radioativa, na atmosfera. O acidente atingiu o nível sete, o mais grave da Escala Internacional de Acidentes Nucleares (INES).

A liberação de material radioativo da usina ocorreu por, pelo menos, dez dias. Os materiais de maior impacto e com mais perigo à exposição foram o Iodo-131, o gás xénon e o cézio -137 em um montante de 5% de todo o material radioativo de Chernobyl, estimado em 192 toneladas (BEZERRA, 2019).

Após a explosão do reator, vários trabalhadores foram enviados ao local, para combater as chamas. Sem equipamento adequado, muitos morreram na tentativa de conter a radiação. A solução foi construir uma estrutura de concreto, aço e chumbo, para cobrir a área da explosão. Dois trabalhadores da fábrica de Chernobyl morreram na noite do acidente e outras 28 pessoas morreram em poucas semanas, como resultado de um envenenamento agudo por radiação (Majores Acidentes Nucleares, 2020). A magnitude do acidente foi considerável, com um volume de partículas radioativa 400 vezes maior do que o emitido pela bomba atômica de Hiroshima, lançada no Japão, durante a Segunda Guerra (Majores Acidentes Nucleares, 2020).

O acidente do reator nuclear de Chernobyl, que resultou em contaminação generalizada com radiocésio, levou a estudos sobre o uso de compostos do azul da Prússia (AzP) como medida preventiva para reduzir o teor de césio-137 e césio-134 em produtos de origem animal. Uma consideração importante no uso do composto na agricultura foi uma eventual toxicidade, razão pela qual são importantes os estudos realizados com animais de laboratório, animais domesticados e com humanos, investigando possíveis efeitos tóxicos do produto. Tais estudos mostraram que os compostos à base de azul da Prússia não tiveram efeitos adversos na saúde animal e que, além disso, nenhum efeito tóxico foi observado nas pessoas quando o produto foi usado experimentalmente ou terapeuticamente (FAUSTINO, 2008).

2.3.2 Acidente de Goiânia – Brasil

A remoção de uma fonte de césio - 137 de uma instalação de radioterapia em Goiânia, deu origem a um acidente radiológico em setembro de 1987, cujas proporções foram agravadas no intervalo de 16 dias. Desde o princípio deste acidente, uma série de eventos resultou na contaminação de pessoas e do ambiente local, que continuaram até o momento de sua notificação e da busca por ajuda (ROSENTHAL *et. al*, 1990).

Foi o maior acidente radioativo da história do Brasil e resultou de uma combinação de negligência com a falta de conhecimento da população. O acidente aconteceu no dia 13 de setembro de 1987, quando, dois catadores encontraram uma cápsula de chumbo contendo cerca de 20 gramas de cloreto de césio-137 (CsCl) que havia sido removida de um aparelho de radioterapia abandonado do Instituto

Goiano de Radiologia – IGR. Após desmontarem o aparelho, venderam-no a um ferro-velho sem ter a noção de que se tratava de um material altamente radioativo: o céσιο – 137. O pó de coloração azul, que se encontrava no interior do equipamento, atraía as pessoas. A cápsula guardava 19,26 gramas de cloreto de céσιο (céσιο 137) (NASCIMENTO, 2017). Na tarde de 29 de setembro de 1987, um físico de Goiânia notificou a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) do grave acidente radiológico (IAEA, 1988).

Os técnicos da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) começaram então os trabalhos de descontaminação, imediatamente após chegarem à cidade, porém pouco tempo depois centenas de pessoas apresentaram os sintomas do contato com o céσιο e foram colocadas de quarentena no estádio Olímpico, onde passaram por uma triagem visando identificar o grau da contaminação (NASCIMENTO, 2017).

Dentre as prioridades estabelecidas pela CNEN para organizar as ações em Goiânia, destacam-se o atendimento às vítimas e população, a identificação dos focos de contaminação e a eliminação ou diminuição da dispersão de Céσιο - I37 para o meio ambiente. Parte importante das ações foi realizada com a administração do azul da Prússia (AzP). Pacientes que necessitaram de tratamento especializado (14 indivíduos) foram transferidos para o Hospital Naval Marcílio Dias, no Rio de Janeiro, equipado para receber vítimas de acidentes nucleares, pois integra o plano de emergência da usina nuclear de Angra dos Reis, no Rio de Janeiro (IAEA, 1988).

No acidente, um total de 244 pessoas foram expostas ao radiocéσιο, sendo que 104 apresentaram evidências de contaminação interna. Apesar de ser um evento trágico, este terrível desastre de radiação proporcionou uma oportunidade de coletar sistematicamente dados sobre a eficácia do azul da Prússia no tratamento de envenenamento por radiocéσιο em humanos (THOMPSON, 2012).

O acidente de Goiânia foi classificado como nível cinco, ou seja, dois níveis abaixo do máximo, sendo, portanto um dos mais importantes após o acidente na usina nuclear de Chernobyl, em 1986, na Ucrânia.

2.4 Azul da Prússia

No século XVIII, em parte devido ao desenvolvimento da química em geral, iniciou-se uma nova etapa na história dos pigmentos. Assim, compostos como o azul da Prússia foram criados em razão da descoberta de novos elementos e da síntese laboratorial de novos materiais (CRUZ, 2004).

O azul da Prússia foi o primeiro pigmento quimicamente sintetizado e foi obtido na Alemanha em 1704 por Diesbach e Dippel. Eles estavam manufacturando pigmentos vermelhos usando potássio e outras bases quando, ao contaminarem acidentalmente a mistura com óleo animal, obtiveram uma cor púrpura que logo depois passou a ter uma coloração azul intensa, ao invés do vermelho que eles estavam tentando produzir. O pigmento obtido foi o ferrocianeto férrico que ficou popularmente conhecido como azul da Prússia devido ao fato dele ter sido muito utilizado na pintura dos uniformes dos militares Prussianos (Figura: 2), (BERNARDES, 2012).

Por causa do grande sucesso comercial, houve a tentativa de proteger o segredo de sua produção, mas ele foi descoberto e em 1724 passou a ser distribuído, sendo produzido e pesquisado em vários países europeus (KRAFT, 2008).

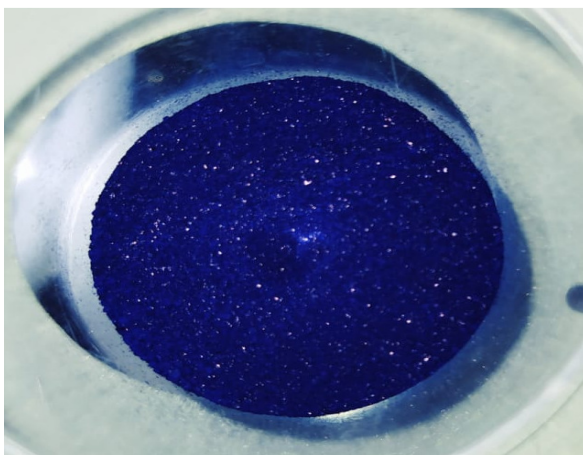


Figura 2: Azul da Prússia

Fonte: SALGADO, 2020

O Ferrocianeto de ferro $\text{Fe}_4 [\text{Fe} (\text{CN})_6]_3$, possui uma fórmula empírica como apresentada na (Figura: 3) e número de registro do CAS (*Chemical Abstracts Service*) 14038-43-8 (RUELA *et al*, 2016).

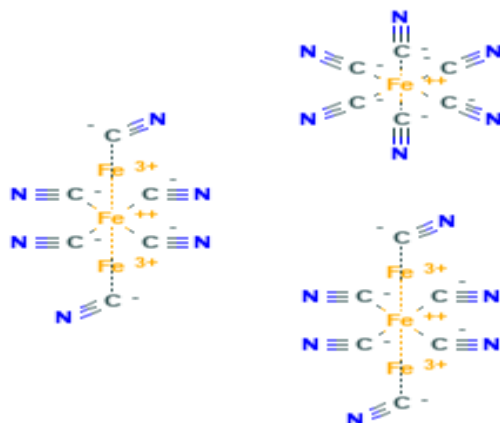


Figura 3: Representation of the 2 D Chemical Structure of Prussian Blue

Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2724251#section=2D-Structure>

Em 1963, o médico e farmacologista croata Vladimir Nigrovic após experiências bem sucedidas com ratos, descobriu que ao administrar o azul da Prússia, a excreção de céσιο do corpo era significativamente melhorada (LONG, 2019; LARIONOVA, 2019).

Posteriormente, em 1969, o médico alemão Horst Heydlauf propôs o uso do azul da Prússia administrado por via oral como antídoto eficaz contra o envenenamento por tálio (LONG, 2016; LARIONOVA, 2019).

Em razão da grande afinidade por céσιο e tálio, o azul da Prússia quando ingerido como parte de um protocolo terapêutico, reterá estes componentes, promovendo a sua excreção pelo intestino (MUKHERJEE *et al*, 2020).

Se utilizado em até 10 minutos após a contaminação radioativa, reduzirá a absorção do contaminante em até 40% e, como não é absorvido e não é tóxico, é portanto, isento de contra indicações (ConFarMarinha, 2008).

Como efeitos secundários, o mais comum é a obstipação podendo em alguns casos surgir hipocalcemia. No caso do paciente estar obstipado (o que pode acontecer mais em razão da intoxicação radioativa do que propriamente do tratamento), o azul da Prússia poderá ser dissolvido em uma solução de manitol, acompanhada de uma dieta rica em fibras (FERNANDES & SANTOS, 2012).

Embora o azul da Prússia seja um antídoto usado contra o envenenamento por céσιο radioativo e tálio, é essencial diferenciá-lo daquele utilizado como pigmento azul por artistas. O azul a Prússia medicamentoso foi projetado para fins medicinais e o artístico, se utilizado como automedicação poderá causar grandes prejuízos à saúde (TECNÓLOGO, 2011).

O composto é conhecido pela comunidade científica a partir de sua descoberta há 300 anos. Desde então atrai muita pesquisa na procura por novas e promissoras áreas para uso. Em razão de sua natureza porosa e das propriedades eletroquímicas, bioquímicas e magnéticas derivadas de um complexo de coordenação de valências mistas, o azul da Prússia é um candidato para várias aplicações, incluindo catálise, fotônica, armazenamento de energia, dispositivos magneto-ópticos e corante para estudo histológico. Além disso, o azul da Prússia é altamente biocompatível e biodegradável por natureza, o que aumenta a sua utilidade em várias aplicações biomédicas (MUKHERJEE *et al*, 2020).

Vários estudos pré-clínicos e clínicos avaliaram o seu uso como um possível agente de investigação visando aumentar a excreção de cátions metálicos do corpo. Todavia, poucos são os dados publicados detalhando a capacidade de ligação do céσιο ao AzP *in vitro* sob várias condições químicas e físicas (FAUSTINO, 2008).

Com o aumento no número de cânceres, a abordagem teranóstica baseada em nanomedicina e a aplicação da nanotecnologia em biologia e medicina, ganhou recentemente, enorme atenção na área da saúde. Devido às suas propriedades físico-químicas, o azul da Prússia é um bom candidato para este uso e desde a década passada grupos demonstraram suas aplicações de teranósticos de câncer como: entrega de medicamentos, ressonância magnética, imagem por contraste CT, terapia fototérmica, entre outros, empregando nanopartículas de azul da Prússia. Assim, nano partículas de azul da Prússia (PBNPs) e seus análogos podem ser úteis para um potencial teranóstico do câncer em um futuro próximo (PATRA, 2016).

Em Outubro de 2003, o azul do Prússia com nome comercial de Radiogardase® passou a ser a primeira medida médica aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), departamento americano de regulação de medicamentos, drogas e alimentos, que o considera um antídoto para

envenenamento radioativo por césio e tálio e tálio não radioativo. Disponibilizado na forma de pó azul em cápsulas de gelatina de 500 mg para uso oral, a Radiogardase® é fabricada na Alemanha pela *HEYL Chemisch – phamazeutische Fabrik GmbH & Co.KG* (Figura: 4) (*Food and Drug Administration*, 2003).



Figura 4: Radiogardase® - azul da Prússia Alemão

Fonte: medical.com/radiogardase-prussian-blue-05gram

O azul da Prússia teve uma grande participação na medicina em 1986, quando ocorreu o acidente nuclear em Chernobyl (Rússia) e muitas pessoas foram irradiadas e contaminadas com césio. Um ano mais tarde, quando do acidente nuclear em Goiânia (Brasil) onde muitas pessoas também foram contaminadas com césio, o composto foi novamente muito importante, pois foi um dos principais medicamentos indicados aos pacientes contaminados, tendo sido decisivo na redução da contaminação radioativa deles (ARNALDO & MEDEIROS, 1988).

O azul da Prússia é uma droga segura para a maioria da população adulta e crianças de 02 a 12 anos. No que diz respeito à gravidez, o composto está classificado na categoria C “risco fetal desconhecido, por falta de estudos alargados”. Este fato indica que o composto carece de maiores investigações, uma vez que não existe um consenso acerca de uma dose segura. Contudo, em razão da intoxicação com césio ou tálio ter graves consequências e também pelo fato do composto não ser absorvido, a análise risco-benefício favorece o seu uso como antídoto nos casos de acidentes (Radiogardase-Cs, 2015).

Na literatura são poucas as informações disponíveis abordando carcinogenicidade, imunotoxicologia ou genotoxicidade (RUELA *et al*, 2016).

Após o acidente de Goiânia, o Laboratório Farmacêutico da Marinha do Brasil (LFM) desenvolveu uma versão nacional do azul da Prússia para substituir a Radiogardase®, visando cumprir os requisitos necessários à prontificação do Plano de Emergência Nuclear Brasileiro. Entretanto a formulação nacional está ainda sendo avaliada quanto aos aspectos físicos, químicos e biológicos (REVISTA NAVIGATOR, 2008).

2.4.1 A fabricação do azul da Prússia pelo Laboratório Farmacêutico da Marinha (LFM)

À época do acidente radioativo de Goiânia (1987), a Diretoria de Saúde da Marinha, em conjunto com especialistas em Radioproteção e em Medicina Nuclear, apurou que no acidente em Chernobyl as vítimas também haviam sido irradiadas e contaminadas por céσιο-137 (ARNALDO & MEDEIROS, 1988).

Sugeriu-se então, que fosse utilizado o produto denominado Radiogardase®, o que levou a uma importação imediata do composto para uso no tratamento das vítimas brasileiras (ARNALDO & MEDEIROS, 1988).

Após a chegada do produto, farmacêuticos do Hospital Central da Marinha (HCM) passaram a pesquisá-lo e a consequência foi a produção de uma amostra do medicamento em caráter experimental (REVISTA NAVIGATOR, 2008).

Os primeiros ensaios demonstraram que o composto nacional captava cerca de 90% do céσιο no teste *in vitro*, enquanto o alemão captava em torno de 35%.

Desta forma os farmacêuticos do HCM, em conjunto com os profissionais do Laboratório Farmacêutico da Marinha LFM, começaram a fabricação de maiores quantidades de azul da Prússia, o que possibilitou a realização de outros ensaios visando a sua aplicação superficial no corpo de vítimas e na superfície de materiais contaminados pelo céσιο. Durante todo este processo o produto foi testado no laboratório do Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD) da Marinha no Rio de Janeiro (Figura: 5) (REVISTA NAVIGATOR, 2008).



Figura 5: Azul da Prússia Brasileiro (Laboratório Farmacêutico da Marinha)

Fonte: SALGADO, 2020

Estava assim criada a tecnologia nacional de produção do azul da Prússia pela Marinha do Brasil e pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), através do IRD (REVISTA NAVIGATOR ESPECIAL, 2008).

2.5 Toxicologia do céσιο

O céσιο - 137 descoberto em 1941 é um isótopo radioativo oriundo da fissão nuclear de urânio ou de plutônio. A partir de sua desintegração em bário, o composto passa a emitir radiações gama as quais são extremamente nocivas à saúde. Contudo, seu uso na medicina é cada vez maior em razão dele possibilitar o tratamento de diversos tipos de cânceres.

O céσιο 137 e 134 são dois radioisótopos de céσιο que apresentam risco potencial para contaminação interna. O céσιο134 possui meia vida radioativa de 2,1 anos, decai tanto por emissão do tipo β (beta) quanto do tipo γ (gama). O céσιο 137 possui meia vida de 30anos, decai por emissão do tipo β e é o mais comum subproduto do urânio 235, podendo ser componente ativo de fontes seladas de radiação em clínicas, laboratórios e indústrias. Além disso, é um importante radionucleotídeo na terapia oncológica e está presente também em armas nucleares, nas chamadas “bombas sujas” (RUELA *et al*, 2016).

O céσιο-137 é perigoso à saúde humana por causar infertilidade e câncer em pequenas doses. Os principais sintomas de contaminação são náusea, vômito, diarréia e tonturas, sintomas clássicos da síndrome aguda de radiação,

podendo causar supressão da medula óssea com risco de infecção, lesões dérmicas, hemorragia e até mesmo óbito (BITELLI, 1982).

Seu comportamento químico e bioquímico é muito semelhante ao do potássio. É rapidamente absorvido e desaparece em pouco tempo do plasma, sendo captado pelas células vermelhas do sangue. O céσιο é solúvel nos fluidos do corpo e é distribuído quase que uniformemente através dele, sendo eliminado pelos rins. Os íons de céσιο podem causar bloqueio nos canais de potássio de membranas biológicas, onde adquire característica bioacumulativa, inutilizando a funcionalidade da bomba de sódio/potássio.

Uma vez que o céσιο entra no corpo é uniformemente distribuído pelo sistema, com as concentrações mais altas encontradas no fígado, músculos esqueléticos e glóbulos vermelhos. Os sintomas dependem da fonte de contato e da quantidade de exposição. A exposição cutânea pode variar de leve irritação da pele a lesões necrosantes (O Céσιο¹³⁷, 2008).

O céσιο é bem absorvido por via oral e segue a cinética de primeira ordem durante a eliminação, é eliminado principalmente pelos rins, com cerca de 10% de excreção fecal. A meia-vida fisiológica da excreção de céσιο em humanos é de 50 a 150 dias. Pesquisadores tentaram correlacionar à idade, altura, peso e sexo a meia-vida da taxa de eliminação individual. Os dados sugerem que o peso parece ser o melhor preditor da meia-vida de eliminação do céσιο (THOMPSON, 2012).

A contaminação por céσιο-137 pode ser prevenida com a construção de sarcófagos de isolamento do material radioativo, como o realizado para conter a radiação após o acidente de Chernobyl, e é remediada com lavagem das roupas dos contaminados com água e sabão. Também se utiliza nos casos de contaminação, a administração por ingestão de azul da Prússia, um quelante que atua como uma resina de troca iônica reduzindo os efeitos da radiação.

2.6 Toxicologia do tálio

O tálio é um elemento natural extremamente tóxico que tem grande variedade de aplicações. Contudo, a exposição a uma dose elevada deste elemento resulta em graves danos ao cérebro podendo, inclusive, levar à morte.

Os sais de tálio têm sido utilizados como agentes medicinais, como ingredientes-chave em vários processos de fabricação e como um potente rodenticida. Além disso, as preocupações ambientais já eram consideradas no princípio deste século, pois o tálio é também um produto residual da combustão do carvão e da fabricação de cimento (KEMNIC & COLEMAN, 2019).

Outros compostos de tálio são utilizados na fabricação de semicondutores, fotocélulas, vidro óptico entre outros. Contudo, sua forma radioativa (Tálio-201) é amplamente utilizada em doses muito pequenas como medicamento aprovado e empregado para radio-imagem. A exposição aguda ao tálio radioativo ou não-radioativo de alta dose é geralmente caracterizada por sintomas gastrointestinais graves, seguidos de sintomas neurológicos que podem levar à morte. A toxicidade resultante da exposição crônica ao tálio é caracterizada por várias alterações neurológicas. O tálio-201 também foi mencionado como um componente potencial de bomba suja (*Food and Drug Administration*, 2003).

Os sais de tálio são de rápida absorção por praticamente todas as vias, sendo a exposição gastrointestinal a via mais comum para produzir toxicidade. O tálio entra nas células por um processo único, governado por sua similaridade de carga e raio iônico ao potássio. Embora o mecanismo exato de toxicidade não tenha sido estabelecido, o tálio interfere na produção de energia em etapas essenciais como da glicólise, do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa (KEMNIC & COLEMAN, 2019).

As principais manifestações de toxicidade consistem em uma neuropatia sensorial e alopecia rapidamente progressiva, ascendente e extremamente dolorosa. Ao contrário da exposição à maioria dos sais metálicos, os sintomas gastrointestinais da toxicidade do tálio são relativamente pequenos e a constipação é mais característica do que a diarreia. O tálio também atravessa a placenta livremente e produz anormalidades em animais, além de morte fetal, toxicidade evidente de anormalidades congênitas em humanos. Os esforços de saúde pública devem se concentrar em maiores restrições ao acesso e uso de sais de tálio (HOFFMAN, 2003).

Resultados obtidos em tratamentos de intoxicação com o tálio indicam que o azul da Prússia reduziu à meia-vida biológica dele de 08 para 03 dias (BARBIER, 1974; VAN KESTEREN, 1980; DE GROOT, 1985; E VRIJ, 1995).

O azul da Prússia demonstrou ser mais bem-sucedido e é aprovado pela administração de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos (KEMNIC & COLEMAN, 2019).

2.7 O Cultivo de embriões

2.7.1 Meios de cultivo e condições adequadas para o desenvolvimento embrionário

Atualmente os meios de cultura podem ser adquiridos comercialmente ou produzidos em laboratórios de pesquisa. A maioria dos meios adquiridos já se encontra pronto para utilização e tem a vantagem de possuírem o controle de qualidade e a segurança necessária para uso em cultivo de embriões.

O embrião é um organismo complexo e o sucesso de seu desenvolvimento *in vitro* depende das condições oferecidas à ele durante o cultivo (AOKI, 2005). Existem inúmeros relatos relacionando os meios e as condições de laboratório como fatores intervenientes ao sucesso, pois o assunto é multifacetado, complexo e em certas situações práticas pode sofrer variações (SIMOPOULOU, 2018).

Como os embriões de mamíferos são muito sensíveis ao ambiente de cultivo, é importante manter as condições estáveis (ITOI, 2012).

A adição de aminoácidos selecionados, glicose, fosfatase, insulina, oligoelementos e antibióticos são alguns dos inúmeros componentes introduzidos com o objetivo de servir como “protetores” e “promotores”, enriquecendo o potencial do meio para cultivo (SIMOPOULOU, 2018).

Desta forma, apesar da diversidade de meios disponíveis para o cultivo, alguns componentes, tais como carboidratos, sais minerais, proteínas, vitaminas, antibióticos, EDTA, aminoácidos e água entre outros, são capazes de interferir no desenvolvimento embrionário *in vitro*, pois eles têm a função de fornecer energia; manter a estabilidade da cultura durante o cultivo e reduzir as chances de sua contaminação.

O piruvato de sódio e lactato de cálcio são fontes de energia e de carbono, essenciais no início do desenvolvimento embrionário. Também a glicose, em um segundo momento, participa como fonte energética indispensável para os estágios mais avançados. Os sais minerais, como o cálcio, serão importantes na compactação celular, enquanto o sódio atuará no controle da osmolaridade.

Com relação à manutenção da estabilidade, a albumina é a proteína mais comumente utilizada para absorção de toxinas e regulação da osmolaridade, enquanto as vitaminas participam como importantes antioxidantes. Para a proteção durante o desenvolvimento dos embriões, os antibióticos gentamicina, penicilina ou estreptomicina poderão ser utilizados. Além desses componentes, o EDTA, caracterizado por ser um agente quelante de metais como cálcio e ferro, atuará na diminuição do estresse oxidativo, sendo fundamental nos estágios iniciais do desenvolvimento. Além disso, os aminoácidos presentes no meio de cultivo atuarão também na proliferação e diferenciação celular, principalmente nos estágios mais avançados do desenvolvimento (COSSIELLO, 2009).

Além destes fatores, também a temperatura e a umidade serão indispensáveis e atuarão “lado a lado” para garantir a estabilidade no cultivo. As reações bioquímicas dependem da temperatura e esta por sua vez, provoca a evaporação da água alterando a concentração do meio. Níveis adequados de umidade evitam que a evaporação aconteça, reduzindo a perturbação da osmolaridade do meio o que, caso contrário, seria catastrófico para o embrião (SIMOPOULOU, 2018).

Outro elemento que melhora o sistema de cultivo dos embriões é a fase gasosa. Em geral acredita-se que os embriões de mamíferos sejam sensíveis à fase gasosa utilizada e que um suprimento contínuo de CO₂ é essencial para manter o pH do meio e a boa qualidade dos embriões. Quando os embriões de camundongos por exemplo, são cultivados com uma porcentagem baixa de CO₂, e o pH do meio fica entre 8,1 a 8,3 os indivíduos não conseguirão atingir o estágio de blastocisto (ITOI, 2012).

Desta forma, é fundamental a atenção com a temperatura; pH e umidade além do equilíbrio correto dos gases na manutenção do meio. O controle cuidadoso desses parâmetros permite que os embriões de camundongos sobrevivam e se desenvolvam de maneira similar aos indivíduos dentro do útero (UDAN, 2010).

Contudo, infelizmente a cultura *in vitro* pode levar a alterações epigenéticas no genoma embrionário e também influenciar a expressão gênica de maneira global, que juntas podem causar em resultados adversos no desenvolvimento (ROBERTS, 2005).

O cultivo dos embriões por vários dias antes da transferência demonstra que os indivíduos que se dividem mais rapidamente e atingem o estágio inicial de blastocisto, são provavelmente os mais competentes em termos de desenvolvimento.

Desta forma, diante da grande variedade de meios existentes, a escolha do protocolo de cultivo deverá considerar o sistema empregado, o qual necessitará proporcionar as condições adequadas para as primeiras clivagens, e para a ativação do genoma embrionário. O sistema de cultivo permite a manutenção da fisiologia celular e a regulação da expressão gênica, fatores indispensáveis ao controle do desenvolvimento embrionário (ROBERTS, 2005).

Exemplos da importância no controle das variáveis é o fato do metabolismo do embrião, assim como a função meiótica e o comportamento dos gametas, ser afetados pela faixa de temperatura à qual o embrião é exposto (SIMOPOULOU, 2018).

2.7.2 Embriotoxicidade

O cultivo de embriões *in vitro* é uma biotecnologia importante para a reprodução e uma ferramenta valiosa para estudos do desenvolvimento embrionário. É um excelente modelo para averiguações de processos tóxicos e interações presentes no ambiente *in vitro*. Os ensaios mais complexos nessa área utilizam embriões de roedores pós-implantação isolados, cultivados *in vitro* durante a fase de organogênese.

A toxicidade do desenvolvimento refere-se a efeitos tóxicos adversos ao embrião ou feto em desenvolvimento.

Produtos químicos causam toxicidade no desenvolvimento atuando diretamente nas células do embrião ou feto, causando morte ou dano celular ou levando ao desenvolvimento anormal de órgãos. Também é possível que alguns óvulos fertilizados mutados, se desenvolvam em embriões anormais (ChemsafetyPRO, 2019).

Os estudos de toxicidade demonstram que diversas substâncias podem representar um risco para o feto em desenvolvimento se mulheres grávidas forem expostas: nanopartículas e radiação, gases e solventes, fumo, álcool e abuso de drogas, aditivos alimentares, nutracêuticos e farmacêuticos e metais, entre outros.

As agências reguladoras usam os resultados destes estudos que são conduzidos com animais, para ajudar a definir diretrizes de exposição humana (RAMESH, 2010).

O teste de embriotoxicidade na cultura de embriões inteiros de ratos ou camundongos pós-implantação destina-se a identificar substâncias com a capacidade de induzir malformações. O estudo se baseia na exposição *in vitro* de embriões durante o período em que ocorrem os principais eventos da organogênese (PAMIES *et al*, 2011).

A modificação epigenética do genoma é um processo dinâmico e não está restrita a nenhuma parte específica do ciclo de vida de um organismo, começa no nível das células germinativas em desenvolvimento no embrião e continua ao longo da vida.

Marcas epigenéticas específicas podem ser estabelecidas no genoma por vários fatores como: ambientais, nutrição materna, durante a gravidez até cuidados pós-natais e exposição a produtos químicos ambientais. O estudo da epigenética é importante para muitos ramos da ciência, incluindo a biologia, toxicologia, psicologia e ciências sociais (KANEKO, 2017).

2.7.3 Desenvolvimento embrionário inicial

O desenvolvimento embrionário do camundongo demora de 18 a 20 dias para ser completado, dependendo da linhagem (Figura: 6). Os dois primeiros tipos de células diferenciadas estão presentes no blastocisto com 3,5 dias após a fertilização, e a implantação ocorrerá 01 dia depois (KISPERT & GOSSLER, 2012).

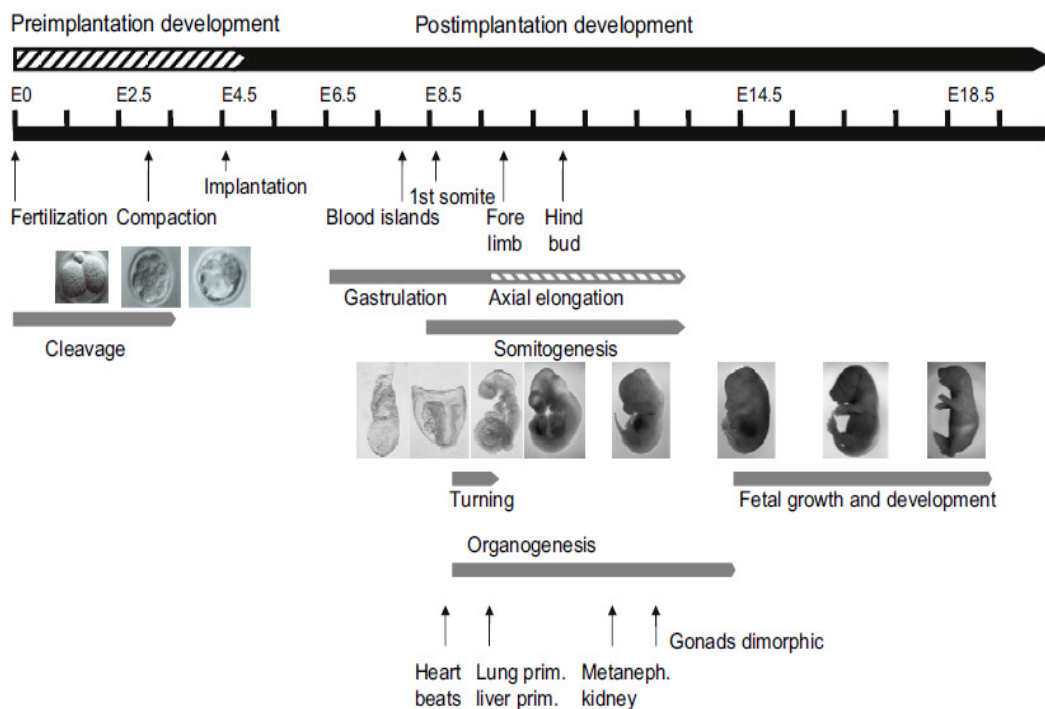


Figura 6: Visão geral do desenvolvimento do camundongo (E0 o dia do plug). O desenvolvimento embrionário do camundongo leva aproximadamente 19 dias. As fases pré e pós-implantação são indicadas acima da linha do tempo, eventos e processos críticos são indicados abaixo da linha do tempo

Fonte: The laboratory mouse, 2012: Early Mouse Development (Chapter 2.1)

Em cada ciclo hormonal, que leva cerca de 4-5 dias no camundongo (ciclo estral), apenas alguns folículos respondem a um aumento no nível do hormônio folículo estimulante (FSH), amadurecem, acumulam líquidos e se movem em direção à periferia do ovário. Pouco antes da ovulação aumenta a quantidade do hormônio luteinizante (LH) circulante; aumenta a maturação nuclear do ovo e tem início a desintegração da membrana nuclear (quebra da vesícula germinativa) e a retomada da meiose.

Após a ovulação, os ovos se encaminham para a ampola em razão dos movimentos de cílios presentes nas células epiteliais que revestem a abertura do oviduto (infundíbulo). Cada ovo é cercado por sua zona pelúcida e por células do *cúmulus*, que é formada por uma matriz extracelular de proteínas e ácido hialurônico (BOS-MIKICH, 2008).

Como em outros mamíferos, o esperma ejaculado não é capaz de fertilizar o óvulo de imediato; ele se tornará competente para fazê-lo no decorrer de sua permanência no trato reprodutivo da fêmea (KISPERT & GOSSLER, 2012).

Assim, a fecundação se inicia somente após a capacitação dos espermatozoides no interior do aparelho reprodutor da fêmea. Sem ela, as alterações fisiológicas sofridas pelos gametas do macho durante a penetração nos envoltórios do ovócito, e a fundição com a membrana plasmática do gameta feminino não seria possível (BOS-MIKICH, 2008).

O espermatozoide penetra na matriz viscosa do ácido hialurônico ao redor das células do *cumulus*, para associar-se à superfície da zona pelúcida. Em seguida ocorre a sua incorporação no citoplasma do óvulo e ativação do mesmo. A zona pelúcida é composta de três proteínas glicosiladas: Zp1, Zp2 e Zp3, o que confere relativa complexidade ao processo (BLEIL, *et al.*, 1980; CHOI, *et al.*, 2015).

Estudos indicam que a Zp3 atua como receptor primário do espermatozoide, enquanto a Zp2 desempenha um papel importante na prevenção da polispermia. O Zp1 reticula o Zp2 / Zp3 para criar a estrutura filamentosa da zona pelúcida (WASSARMAN *et al.*, 2008).

Do lado do espermatozoide, a reação do acrossomo libera enzimas proteolíticas e glicolíticas que permitem ao gameta masculino penetrar a zona pelúcida. Após a proteólise, o espermatozoide que sofreu a reação acrossômica se funde imediatamente com a membrana plasmática do óvulo, desencadeando uma cascata de eventos, que evitam a polispermia e, por fim, levam à formação do zigoto diplóide (KISPERT & GOSSLER, 2012).

Na sequência ocorre a transformação do núcleo do espermatozóide e do ovócito, formando os pronúcleos masculino e feminino no interior da célula. A aproximação dos pronúcleos, sua fusão e o pareamento dos cromossomos condensados na primeira placa metafásica do zigoto, finalizam o processo de fertilização. Neste momento começa o evento que culminará com a primeira clivagem, entendida como a divisão mitótica que ocorre no zigoto produzindo o embrião de duas células que será composto de duas células filhas denominadas blastômeros (De ALMEIDA, 1999; MOORE, 2003; BOS-MIKICH, 2008).

As divisões dos blastômeros nos camundongo, como em outros mamíferos, são lentas. A primeira ocorre cerca de 20 horas após a fertilização (Figura: 7). As

próximas seguirão intervalos de aproximadamente 12 horas, não sendo necessariamente sincrônicas entre os diferentes blastômeros.

Até o estágio de oito células os blastômeros serão células esféricas que são fixadas frouxamente em seus locais de contato. Ao final do estágio de oito células, os blastômeros alteram seu comportamento de adesão e o embrião, agora chamado de mórula, passa por uma significativa mudança morfológica. Nesta mudança os blastômeros se achatam uns aos outros, maximizando o contato célula-célula, e a estrutura anterior que se assemelhava a uma amora será transformada em um agregado compacto de células. Esse fenômeno de compactação é um pré-requisito para a formação do blastocisto. Neste estágio do desenvolvimento a zona pelúcida ainda estará presente, e esse agregado poderá ser localizado no oviduto na porção que faz junção ao útero (BOS-MIKICH, 2008; KISPERT & GOSSLER, 2012).

Na sequência, após a formação da blastocele no dia 3.5 do desenvolvimento embrionário, o blastocisto amadurecerá por mais 24 horas e estará pronto para se implantar na parede uterina. Pouco antes do implante, no dia embrionário 4,5, algumas células da massa celular interna (MCI) se diferenciarão em um segundo tipo de célula epitelial; o endoderme primitivo (pec). Este tecido, que surge na superfície livre da MCI voltado para a blastocele, dará origem às membranas embrionárias, o componente endodérmico do saco vitelino visceral e saco vitelino parietal. As células da MCI restantes, o ectoderme primitivo (epiblasto), ou seja, a camada de células que constituem a parte superior do disco embrionário oriundo da fase de blástula tardia ou trofoblasto inicial, darão origem ao embrião propriamente dito e ao mesoderma extra embrionário. Neste processo as células trofodérmicas (TE) darão origem exclusivamente ao tecido extra-embrionário: âmnion, saco vitelino e alantóide, anexos embrionários importantes na manutenção do feto (KISPERT & GOSSLER, 2012).

Nesta etapa do desenvolvimento embrionário, há o desaparecimento da zona pelúcida e acontece a implantação, ou nidação. Durante a nidação, ocorre lesão do epitélio uterino, das glândulas endometriais e dos vasos.

No início da gestação em camundongos, a placenta é do tipo discoidal e após a união entre a mucosa uterina com as viscosidades coriônicas, passa a ser do tipo hemocorial, pois o corion fetal está em contato quase direto com o sangue

da mãe. Neste caso, apenas três camadas celulares impedem a mistura do sangue fetal com o materno (RIOS, 2014).

Nos camundongos, os locais de implantação são facilmente visíveis em 01 dia após a implantação pelos inchaços decíduos do útero. As interações embrião-útero são controladas por um grande número de moléculas e vias de sinalização (KISPERT & GOSSLER, 2012).

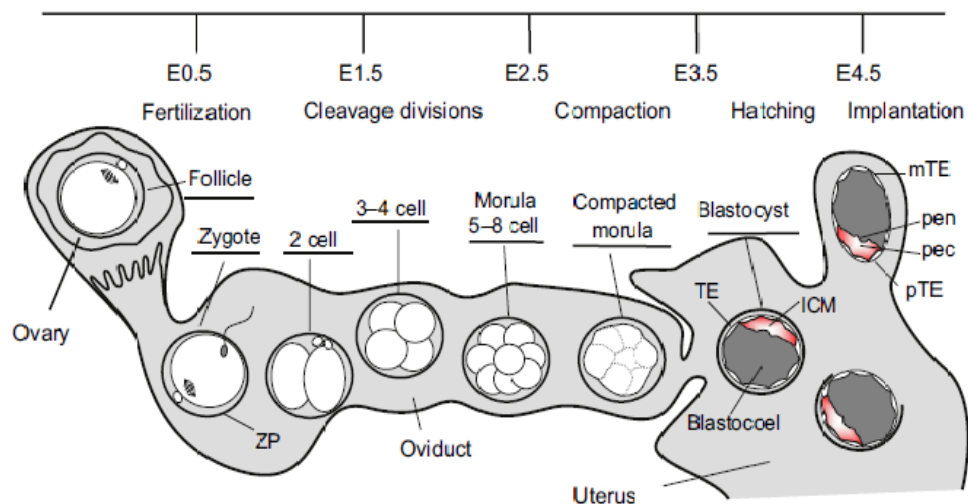
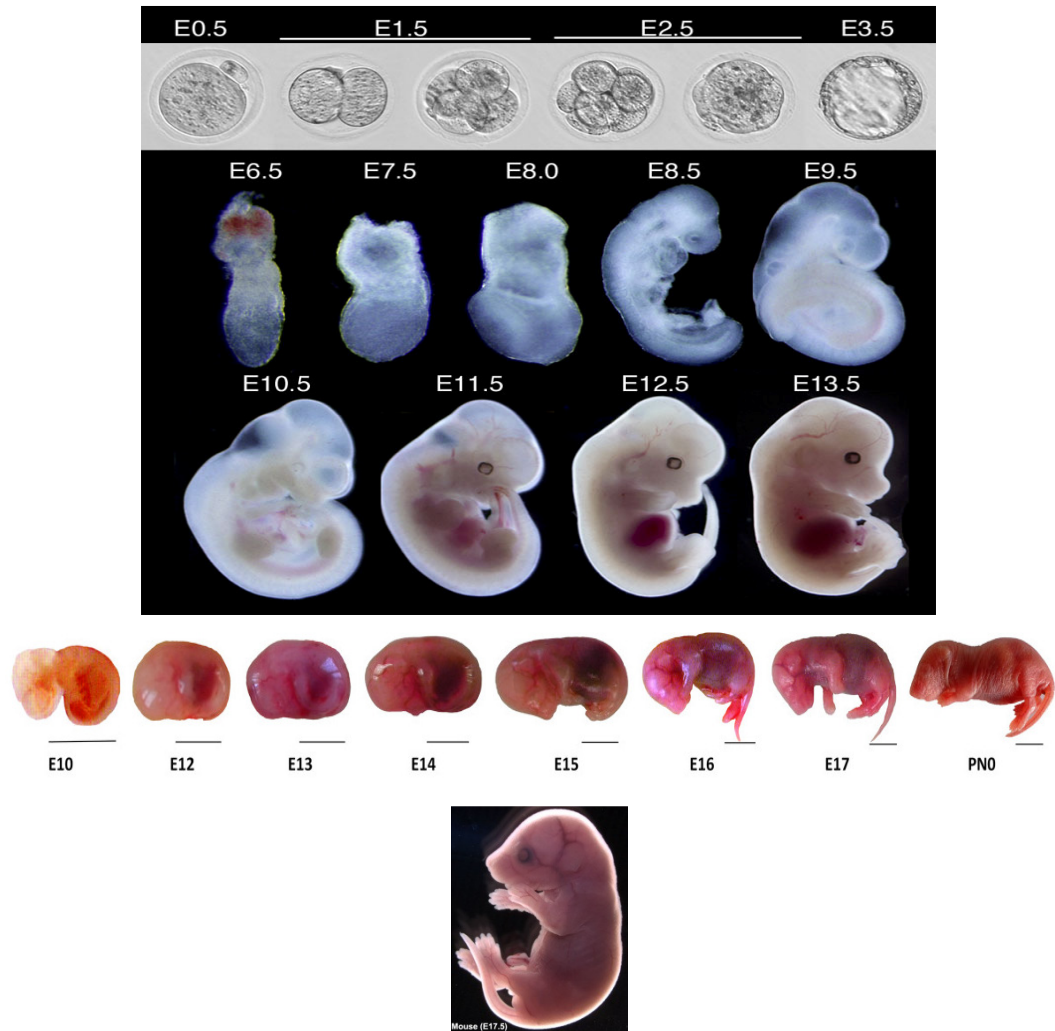


Figura 7: Apresentação esquemática do desenvolvimento do pré-implante de camundongo; A fertilização ocorre na parte próxima ao oviduto, os zigotos sofrem clivagem enquanto migram em direção ao útero; A compactação ocorre no estágio de oito células, para a formação do blastocisto, 3,5 dias, no útero; Quando o blastocisto eclode, ocorre a implantação da massa celular interna (MCI); ectoderme primitivo (pec); endoderme primitivo (pen); trofoblasta (TE); trofoblasta polar (pTE); trofoblasta mural (mTE).

Fonte: The laboratory mouse, 2012: Early Mouse Development (Chapter 2.1)

Após o implante na parede uterina, o desenvolvimento prossegue com a formação do cilindro do ovo e o início da gastrulação por volta do dia embrionário 6,5, causando mudanças morfológicas significativas com a formação das três camadas germinativas embrionárias e o estabelecimento do plano básico do corpo com seus eixos principais. Também serão iniciadas a formação dos órgãos por meio das interações dos tecidos. Como resultado será formado no dia 8,5, um sistema cardiovascular funcional que será seguido pelo estabelecimento da maioria dos órgãos primordiais no dia embrionário 11,5. Em seguida ocorre uma diferenciação ainda mais acentuada dos órgãos acompanhada de um crescimento

do feto até o nascimento no dia embrionário 18.5 (Figuras: 8) (KISPERS & GOSSLER, 2012).



Figuras 8: Diferentes estágios de desenvolvimento do camundongo

Fonte: <https://www.hhmi.org/research/mechanism-and-function-epigenetic-modifications>

Fonte: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Mouse_Timeline_Detailed

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O trabalho em tela tem por objetivo explorar a influência do composto azul da Prússia em diferentes etapas da reprodução em camundongos, comparando o produto fabricado na Alemanha (Radiogardase[®]) com o desenvolvido pelo Laboratório Farmacêutico da Marinha Brasileira (LFM-Br).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência do azul da Prússia sobre o desenvolvimento embrionário de camundongos *in vitro*.
- Avaliar a influência da radiação ionizante sobre o meio de cultivo M16 no desenvolvimento embrionário *in vitro*.
- Avaliar a influência da radiação sobre o azul da Prússia impactando no desenvolvimento embrionário *in vitro*.
- Avaliar a influência da radiação ionizante sobre o embrião e o seu desenvolvimento embrionário *in vitro*.
- Avaliar a proteção de embriões irradiados com diferentes doses na presença do azul da Prússia.
- Avaliar a gestação empregando fêmeas receptoras que receberam embriões irradiados e não irradiados na presença e na ausência de azul da Prússia.
- Avaliar aspectos reprodutivos de colônias formadas a partir da progênie de fêmeas receptoras que receberam embriões cultivados com o azul da Prússia e embriões irradiados e não irradiados na presença e na ausência de azul da Prússia, até a 3^o geração.
- Identificar possíveis danos ao DNA por meio do surgimento de fenótipos alterados após o nascimento de embriões implantados e das progênies de seus acasalamentos, por três gerações.

4. METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 Animais utilizados

Foram utilizados 242 camundongos entre machos e fêmeas com idade de 10 a 12 semanas, da linhagem híbrida B6C3H–F1, formada pelo acasalamento de duas linhagens consanguíneas, fêmeas C57BL/6J e machos C3H/HePAS. As linhagens híbridas apresentam um maior vigor e uma uniformidade genética e fenotípica, sendo muito utilizadas em técnicas de reprodução assistida.

A escolha desta linhagem se deu pelo fato dos parentais serem sensíveis à radiação ionizante e com alto índice de prolificidade, possibilitando uma boa produção de embriões (VILLAVICENCIO,1988).

Os camundongos foram utilizados em diferentes etapas.

A primeira parte dos experimentos foi *in vitro* com testes de cultivo dos embriões e para cumpri-la, foram utilizadas 38 fêmeas doadoras e 20 machos reprodutores.

A segunda parte dos ensaios foi *in vivo* onde foram realizados implantes dos embriões. Nesta parte foram utilizadas 54 fêmeas doadoras e os mesmos machos reprodutores da primeira parte, como forma de se atender aos princípios éticos e às recomendações da CEUA. Nos implantes foram utilizadas 100 fêmeas receptoras e 30 machos vasectomizados.

Na realização das etapas foram utilizados, portanto, um total de 192 fêmeas e 50 machos.

4.2 Manutenção dos animais

Os camundongos eram de padrão SPF (*Specific Pathogen Free*) e foram mantidos em ambiente controlado com barreiras sanitárias SPF no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, na área de animais para laboratório, da Universidade Estadual de Campinas - CEMIB/UNICAMP.

Os grupos experimentais foram mantidos em racks ventiladas da marca ALESCO (Monte Mor, Brasil), com manuseio e troca da cama de maravalha, realizados em cabines de troca classe II A1, uma vez por semana.

Os animais foram submetidos a fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, recebendo água e ração *ad libitum*, ambos autoclavados, sendo a ração da marca NUVILAB CR-1AUTOCLAVÁVEL AE7.

Os experimentos envolvendo animais de laboratório foram aprovados pela CEUA do IPEN registrada com o número 178/16, aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IPEN) do Instituto de Pesquisas Energéticas e nucleares (IPEN-CNEN/SP), em reunião de 24/10/2016. Uma parte dos ensaios foi realizado no Laboratório de Criopreservação e Reprodução Assistida do CEMIB (LabCrio), sendo que neste caso foi emitida a autorização da CEUA local.

4.3 Características reprodutivas das linhagens utilizadas nos experimentos (C57BL/6J, C3H/HePAS e B6C3H-F1)

A linhagem consangüínea C57BL/6J é a mais utilizada nas pesquisas e foi a primeira linhagem a ter seu genoma seqüenciado, e embora seja refratária a muitos tumores, possui fundo permissivo para a maioria das mutações se expressarem. Os camundongos C57BL/6J são os mais utilizados na produção de modelos transgênicos. Eles também são suscetíveis à obesidade induzida pela dieta, diabetes tipo dois e aterosclerose. (CURRER, 2009)

Os camundongos consangüíneos da linhagem C3H/HePAS são de uso geral, em ampla área de pesquisa, incluindo biologia neurosensorial, câncer, imunologia e inflamação. As fêmeas desta linhagem amadurecem sexualmente muito cedo, por volta dos 25 dias.

O desempenho reprodutivo está entre as características mais afetadas pela consangüinidade. No caso da linhagem híbrida F1 (não consangüínea), como conseqüência ao “vigor híbrido” nos aspectos reprodutivos, ela ultrapassará as linhagens consangüíneas em todas as categorias listadas na (Tabela 1). Com os animais não consangüíneos, a frequência de acasalamentos produtivos é próxima de 100%, a idade do primeiro acasalamento pode ser de cinco semanas e as ninhadas podem ter até 16 filhotes. Finalmente, as fêmeas não consangüíneas às vezes podem permanecer férteis até os 18 meses de idade e levar até 10 ninhadas com sucesso ao desmame (informatics.jax.org, 2019; 2020).

Tabela 1 - Parâmetros reprodutivos das linhagens

Linhagens	Acasalamentos produtivos*	Primeiro parto em semanas**	Tamanho da ninhada	Número ninhada	Fecundidade relativa***	Resposta a Superovulação
C57BL/6J	84% (0,84)	6,8	7,0	4,0	23,5	Alta
C3H/HePAS	99% (0,99)	5,9	6,4	3,4	23.4	Alta
B6C3H-F1	100% (1)	5,0	12	8	96.0	Alta

*Considerado como acasalamento produtivo, se nascer um filhote

**Estimado retirando 03 semanas da idade dos pais no primeiro nascimento

***Quantidade de acasalamentos produtivos x Tamanho da ninhada x número de ninhadas

Fonte: informatics.jax.org

4.4 Delineamento experimental

Está apresentada abaixo uma visão geral dos grupos experimentais e em seguida um fluxograma das principais etapas que orientaram o trabalho.

Neste sentido, as informações demonstradas nas tabelas 2 e 3 abaixo, permitirão o entendimento da organização dos grupos utilizados e é também uma estratégia recomendada para o controle de variáveis (PADOVANI, 2014).

A tabela 2 mostra a quantidade de animais (fêmeas e machos) utilizados no grupo *in vitro*, com a quantidade de embriões submetidos somente ao cultivo, e também o grupo *in vivo*, onde os embriões foram cultivados e posteriormente implantados em fêmeas receptoras pseudoprenhes.

Na tabela 3 é possível observar a quantidade de fêmeas (doadoras e receptoras) que foram utilizadas em cada grupo experimental; a quantidade de embriões fornecidos por grupo e a média de embriões coletados por fêmea.

Tabela 2 - Quantidade total de animais utilizados nos experimentos e a quantidade de embriões obtidos

Experimento	Fêmeas doadoras de embriões	Fêmeas receptoras de embriões	Machos reprodutores	Machos vasectomizados	Embriões coletados
<i>In vitro</i>	38	-	20	-	1277
<i>In vivo</i>	54	100		30	1855

Fonte: SALGADO, 2020

Tabela 3 - Número de fêmeas (doadoras e receptoras) e média de embriões coletados por experimento

	Experimentos	Fêmeas Doadoras	Embriões Coletados	Média de Embriões/fêmea	Fêmeas Receptoras
<i>In Vitro</i>	Embriões + AzP Brasil Embriões + AzP Alemão	16	552	34,5	-
	Embriões + Meio M16 irradiado	04	142	35,5	-
	Embriões + Azul da Prússia irradiado	02	58	29	-
	Embriões irradiados	06	200	33,4	-
	Embriões + AzP Brasil + radiação Embriões + AzP Alemão + radiação	10	325	32,5	-
<i>In Vivo</i>	Implantes (embriões + AzP Brasil) Implantes (embriões + AzP Alemão) Implantes (grupo controle)	18	616	34,2	47
	Implantes (embriões irradiados 1 Gy) Implantes (grupo controle)	16	196	35	07
	Implantes (embriões irradiados 1,5 Gy) Implantes (grupo controle)		364		08
	Implantes (embriões + AzP Brasil + radiação) Implantes (embriões + AzP Alemão + radiação) Implantes (grupo controle)	20	679	33,9	38

Fonte: SALGADO, 2020

Conforme pode ser observado pelas tabelas 2 e 3 acima, a proposta do trabalho é complexa, e envolve vários grupos experimentais e diferentes protocolos, com testes *in vitro* e *in vivo*.

A real possibilidade de serem detectados fatores de interferência não previstos, aliada à necessidade de diminuir estes fatores ao mesmo tempo em que a coleta de dados seria otimizada, levou ao desenvolvimento de um fluxograma com o esquema geral das etapas.

Assim, um fluxograma geral do delineamento experimental é apresentado a seguir (Figura: 9).

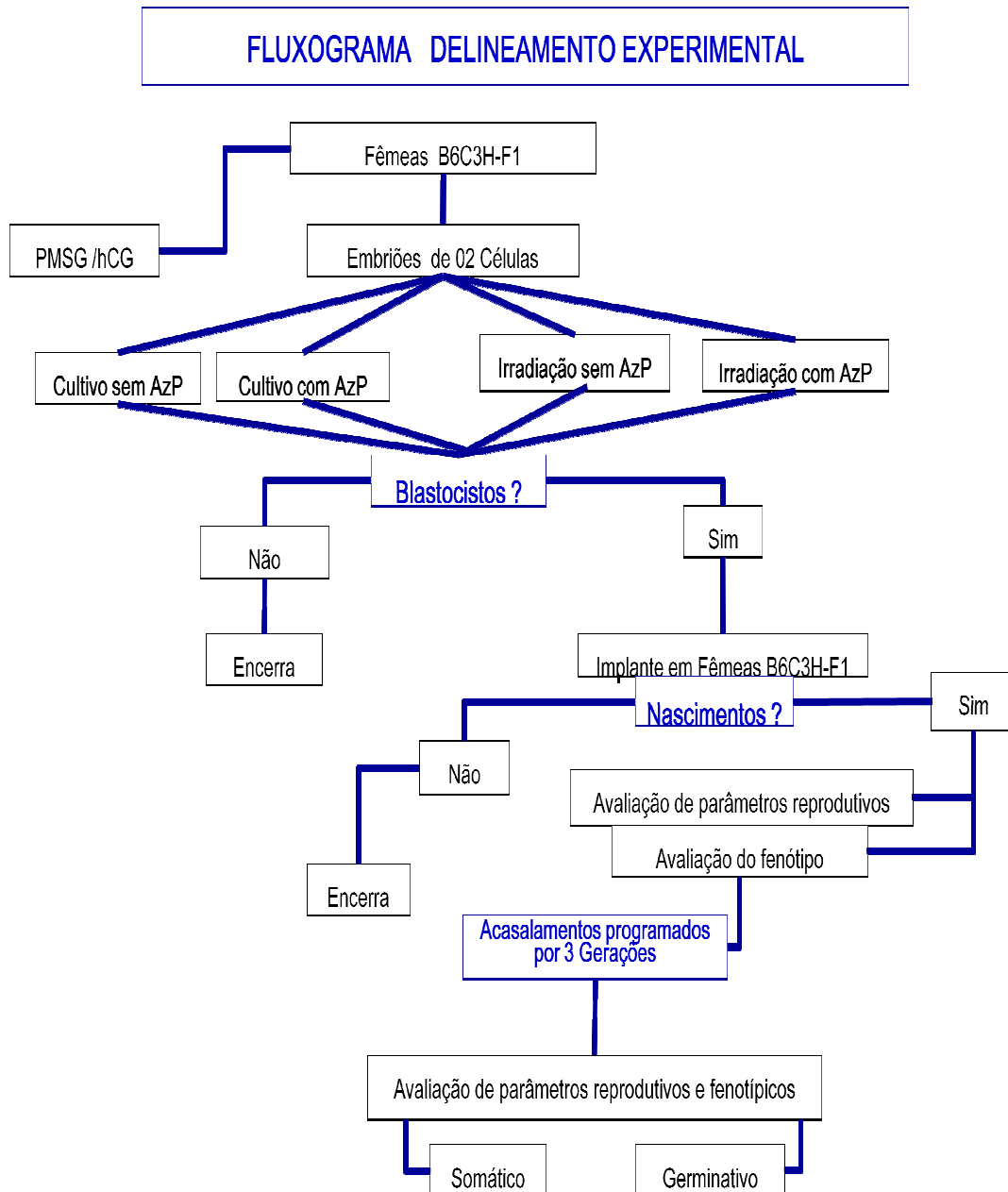


Figura 9: Fluxograma geral do delineamento experimental

Fonte: SALGADO, 2020

4.5 Meios de cultivo e de coleta de embriões

Os meios utilizados foram adquiridos comercialmente da Sigma[®]. O meio M2 (M7167) foi utilizado na coleta e na manipulação dos embriões e o meio M16 (M7292) no cultivo.

Ambos os meios (M2 e M16) são comumente utilizados em técnicas de reprodução assistida que envolvam a manipulação e cultivo *in vitro* de embriões em fase de pré-implantação.

O meio M2 (M7167) é tamponado com HEPES no lugar do bicarbonato, possibilitando uma estabilidade por períodos prolongados fora da incubadora de CO₂. Este gás atua como agente tamponante ou *buffer*, mantendo o pH do meio estável durante o manuseio (WÜTTKE, *et al.*, 1990).

O meio M16 (M7292) é uma solução de bicarbonato de Krebs-Ringer modificada, muito semelhante ao meio Whitten. O meio M16 contém piruvato e lactato como fontes de energia, uma vez que os embriões da fase de pré-implantação não utilizam glicose com eficiência (WHITTEN, 1956; 1968).

Como controle contra contaminantes, ambos os meios foram suplementados com penicilina-potássio-G 0,06 g / L e sulfato de estreptomicina 0,05 g / L.

Antes do uso os meios foram equilibrados em estufa a 5% de CO₂, 37°C e 95% de umidade.

Embora possam ser produzidos em laboratório, a opção por produtos comerciais se deve ao fato destes meios terem a capacidade de apoiar o desenvolvimento de embriões de camundongos desde uma célula até blastocistos expandidos, com um requisito mínimo de 80% de desenvolvimento para blastocisto.

4.6 Coleta dos embriões

Os embriões de todos os grupos experimentais e seus respectivos controles foram obtidos de fêmeas superovuladas (B6C3H-F1) que foram acasaladas com machos da mesma linhagem.

Para a superovulação empregou-se 05 UI do hormônio *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) da marca BioVendor (RP1782725000), seguido da administração, 48 horas após, de 05 UI do hormônio *Chorionic Gonadotropin*

Human (hCG) (Sigma CG5). Os hormônios foram diluídos em solução estéril de salina tamponada (PBS) para uma concentração final de 50 UI/mL e congelados em alíquotas de 1 mL a -20°C até o momento do uso.

Ambos os hormônios foram injetados pela via intraperitoneal (i.p.). O hormônio PMSG estimulante dos folículos foi injetado às 16hs. Após 48hs da administração do PMSG, realizou-se a inoculação do hormônio hCG e logo em seguida as fêmeas foram acasaladas com machos da mesma linhagem híbrida, (KYVELIDOUA, *et al.*, 2011).

Logo pela manhã as fêmeas eram inspecionadas para certificar a presença do tampão vaginal (plug) indicativo da cópula, possibilitando indicar o dia gestacional zero, também considerado como dia 0,5 dpc (dia pós o coito) (Figura: 10) (MONTOLIU, 2011; QIU, 2016).

No dia seguinte ao plug os embriões de 02 células foram coletados da ampola por meio da lavagem do infundíbulo. Na técnica, a fêmea doadora é sacrificada por deslocamento cervical e os seus ovidutos são removidos cirurgicamente. O *flushing* é então realizado com a introdução de uma agulha 26 gauge (G) no infundíbulo, seguido de um fluxo de meio que lava o interior do oviduto removendo os embriões de sua luz como mostrado na (Figura: 11) (SALGADO & PASSOS, 2009).

Neste trabalho foram coletados 3.132 embriões, na primeira parte dos experimentos *in vitro* onde foram realizados os testes de cultivo. Foram coletados 1.277 embriões de 38 fêmeas e na segunda parte do experimento *in vivo* (implante dos embriões), foram coletados 1.855 embriões de 54 fêmeas.

Todos os embriões foram avaliados em estereomicroscópio SMZ800 Nikon.

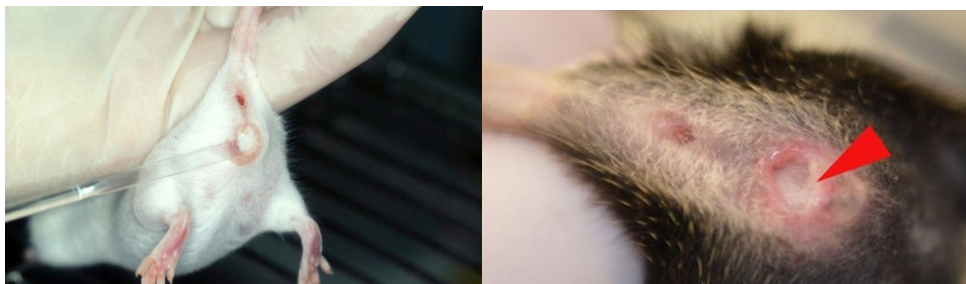


Figura 10: Tampão vaginal formado após a cópula

Fonte: MONTOLIU, 2011; QIU, 2016.

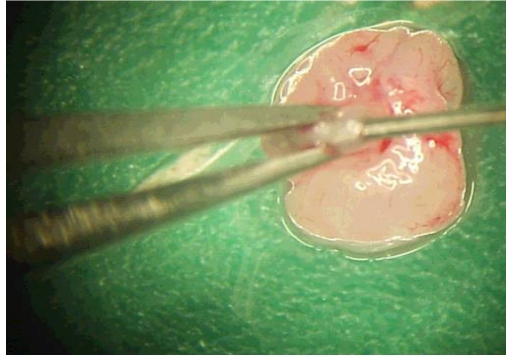


Figura 11: Coleta de embriões por *flushing* (oviduto com agulha na entrada do infundíbulo)

Fonte: SALGADO & PASSOS, 2009

4.7 Machos vasectomizados

A produção de machos vasectomizados é essencial para a indução de pseudoprenhes em fêmeas que são utilizadas em protocolos de transferência de embriões. Para este trabalho, foram vasectomizados 30 machos que foram acasalados com as fêmeas receptoras nos experimentos *in vivo*.

A técnica consiste na cauterização dos vasos deferentes após uma incisão com aproximadamente 05 a 08 mm, que é realizada acima do pênis e a uma distância de 10 mm. Em seguida à abertura do peritônio, o vaso deferente é exposto e cauterizado, promovendo assim uma interrupção no fluxo normal dos espermatozoides (SALGADO & PASSOS, 2017).

Para a realização destes procedimentos os machos foram anestesiados com Cetamina (80-100 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), administrados por via i.p. Foi utilizado um gel oftálmico (Recugel™), para prevenir o ressecamento da córnea durante a cirurgia. Sob anestesia geral, os animais foram colocados sobre uma placa de aquecimento a 37°C.

No pós-operatório, uma única dose de 5,0 mg/kg de hidrocloreto de tramadol (Tramal™) foi administrado subcutaneamente. Os camundongos foram mantidos aquecidos a 37°C até a recuperação completa da anestesia.

Após a vasectomia os animais ficaram alojados individualmente, possibilitando sua recuperação (15 dias), após este período os machos foram acasalados por um período equivalente a 04 ou 05 ciclos reprodutivos da fêmea, para confirmar a sua esterilidade, antes de serem colocados em rotina.

4.8 Preparo das fêmeas receptoras pseudoprenhas

A pseudoprenhes foi induzida pelo acasalamento das fêmeas receptoras com 08 a 12 semanas de idade, com machos vasectomizados da linhagem híbrida (B6C3H-F1).

Na ausência da cópula, o corpo lúteo formado a cada ciclo se degradará. Por outro lado, quando a fêmea é acasalada com um macho vasectomizado, o corpo lúteo persiste levando à pseudoprenhes. Neste caso a fêmea apresentará uma produção contínua de progesterona responsável por manter o comportamento materno. A fêmea então desenvolverá glândulas mamárias, lactará e construirá ninhos possibilitado a transferência embrionária (FOX,2007; *Reproductive Healthcare*, 2015).

Os machos vasectomizados receberam individualmente as fêmeas às 16 horas, e permaneceram acasalados até as 09:30 horas da manhã seguinte, quando foram separados. Em seguida as fêmeas foram examinadas para detectar a presença do plug (tampão vaginal) e as plug positivos foram separadas para posterior implante dos embriões. A observação do plug foi considerado como dia 01 de pseudoprenhes, e as transferências dos embriões foram realizadas na manhã do dia 03, ou seja, aproximadamente 48 horas após a sua detecção.

As fêmeas que não apresentaram plug foram devolvidas ao estoque para serem reacasaladas 02 semanas depois. Após um acasalamento bem-sucedido, o macho ficava em descanso de 2-3 dias.

4.9 Implante de embriões ou transferência embrionária

A transferência embrionária requer um útero receptivo e com as alterações fisiológicas que serão importantes na implantação dos blastocistos (PARIA *et al.*, 2002; WANG, 2006).

Para o implante, as fêmeas após o acasalamento com os machos vasectomizados e que apresentaram plug vaginal, foram anestesiadas com Cetamina (80-100 mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg) injetados via i.p. Durante a cirurgia os olhos dos animais foram protegidos com gel oftálmico (RecugelTM) para evitar o ressecamento.

As cirurgias foram realizadas em ambiente estéril, e as fêmeas foram colocadas sobre uma placa aquecida a 37°C para maior conforto. Uma solução de álcool 70% foi utilizada na preparação pré-operatória da pele e uma incisão com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foi realizada no dorso da fêmea, para que o corno uterino fosse exteriorizado.

Na transferência, com o auxílio de um estereomicroscópio (Nikon SMZ 800 e uma agulha de 26 Gauge (G), foi feito um pequeno furo na parede do útero, na porção superior do corno uterino, por onde os embriões foram introduzidos com o auxílio de uma pipeta de vidro carregada com eles.

Entre 10 a 15 blastocistos foram diretamente introduzidos no corno uterino conforme descrito por (NAKAGATA, 2013).

4.10 Azul da Prússia (AzP)

Foram utilizadas duas formulações do composto azul da Prússia de uso oral: a Radiogardase® produzida na Alemanha e a produzida pelo Laboratório Farmacêutico da Marinha do Brasil -LFM.

A concentração máxima utilizada de 6 mg/mL, teve como base os valores presentes na bula da Radiogardase® (Radiogardase-Cs, 2015).

As cápsulas de ambos os compostos, foram abertas para a retirada do conteúdo interno (pó insolúvel) que foi misturado em meio de cultivo M16.

4.10.1 Diluições do Azul da Prússia (AzP)

O azul da Prússia é insolúvel em água, portanto as concentrações utilizadas foram obtidas com uma adaptação no protocolo de diluição sequencial. Assim, 06 mg dos compostos Alemão (Radiogardase™) e Brasileiro foram pesados em tubos de 1,5 mL (marca eppendorf), que receberam 01 mL de meio de cultivo M16 da Sigma (M7292). Em seguida, uma ponteira para micropipeta de 01 mL de volume teve a sua ponta cortada possibilitando a homogeneização e a distribuição da mistura com o composto. Procedeu-se então com uma diluição sequencial na razão de 1:2, sendo produzidos dois grupos de amostras para cada um dos compostos separadamente: o primeiro com 06; 03 e 1,5 mg/mL e o segundo com 01; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,015 e 0,007 mg/mL. Essas soluções se

constituíram em misturas homogêneas que foram utilizadas na montagem das placas de cultivo.

4.11 Radiações

Nos experimentos com irradiação foram utilizadas doses de 1; 1,5; 4 e 500 Gy.

Foram irradiados: o meio de cultivo M16, o azul da Prússia (AzP) Alemão e Brasileiro e os embriões.

A irradiação foi realizada em fonte de $^{60}\text{Cobalto}$ (Gammacell, modelo 220, número de série 142, fabricante *Atomic Energy of Canada Limited*) no irradiador do SERD-IPEN-CNEN em São Paulo (Figura: 12).



Figura 12: Fonte de $^{60}\text{Cobalto}$ - Gammacell 220 no SERD-IPEN-CNEN

Fonte: ipen.br

4.12 Experimentos *in vitro*

Os testes *in vitro* foram realizados com embriões que foram cultivados na presença de ambos os compostos desde o estágio de 02 células e durante 05 dias até chegarem a blastocisto.

Os indivíduos foram mantidos em estufa de CO_2 e inspecionados diariamente com o uso de um estereomicroscópio SMZ800 da Nikon.

A avaliação morfológica foi utilizada como critério para avaliar o desenvolvimento e para a seleção dos embriões que seriam utilizados posteriormente nos ensaios *in vivo*. Foram considerados de boa qualidade os que apresentaram: divisão celular regular, blastômeros divididos igualmente, zona pelúcida intacta, presença de corpúsculo polar e ausência de fragmentação.

4.12.1 Influência do azul da Prússia (AzP) sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro*

Para avaliar possíveis efeitos tóxicos ao desenvolvimento embrionário, foram preparadas 11 placas de cultivo para cada um dos compostos de AzP Alemão e Brasileiro. As placas eram de 35 mm de diâmetro e receberam 200 µL de cada diluição (06; 03 e 1,5 mg/mL e 01; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,015 e 0,007 mg/mL) e uma placa para o controle que não recebeu AzP.

Os embriões foram obtidos de fêmeas B6C3H-F1 superovuladas como descrito anteriormente.

No dia seguinte ao plug vaginal, os embriões foram coletados e selecionados para cultivo na presença e na ausência do azul da Prússia.

As placas com o meio foram cobertas com óleo para cultivo de embriões da marca Sigma M8410 e mantidas em estufa de CO₂ com 5%, 95% HR e 37°C até o momento do uso.

O cultivo dos embriões se deu com a técnica de cultivo em microgotas sob uma camada de óleo para manter a estabilidade do pH e da osmolaridade (MARTINEZ, *et al.*, 2017).

O desenvolvimento *in vitro*, foi acompanhado até o estágio de blastocisto utilizando-se como critérios de avaliação: divisão regular dos blastômeros, zona pelúcida intacta, presença de corpúsculo polar e ausência de fragmentação.

Os embriões foram avaliados em microscópio estereoscópico SMZ800 da Nikon, desde o início do cultivo (02 células) até o quinto dia, quando os embriões viáveis alcançaram o estágio de blastocisto (Figura: 13).

Como descrito acima, o grupo controle foi constituído de embriões cultivados em meio M16 sem o azul da Prússia.

Este experimento foi realizado também para a identificação da maior dose do composto que permitia o desenvolvimento dos embriões até blastocisto

(concentração inibitória mínima). A identificação desta dose foi necessária para que fosse possível a realização dos experimentos *in vivo*, onde os indivíduos que se desenvolveram na presença dos compostos (brasileiro e alemão) poderiam ser implantados em fêmeas receptoras. Nos experimentos *in vivo* foram transferidos cerca de 10 a 15 embriões por fêmea pseudoprenha.



Figura 13: Desenvolvimento embrionário

Fonte: <https://blogminhafiv.com.br/o-que-acontece-com-o-meu-embriao-ate-hora-da-transferencia/>

4.12.2 Influência da radiação ionizante sobre o meio de cultivo M16 no desenvolvimento embrionário *in vitro*

A radiação ionizante modifica as características do material em que ela incide. Por esta razão o meio que seria utilizado no cultivo de embriões poderia ser alterado impossibilitando o desenvolvimento dos indivíduos.

Desta forma, um experimento foi conduzido para se avaliar possíveis prejuízos causados pela radiação ao meio M16. Para tanto o meio foi irradiado em fonte de ⁶⁰Cobalto, no irradiador do SETRD-IPEN-CNEN/SP nas doses de 01, 1,5 e 4 Gy a uma taxa de dose de 669 KGy/h. Após a irradiação, o meio foi equilibrado em estufa de CO₂ por 1 hora. Em seguida, placas com 35 mm de diâmetro receberam 200µL de meio irradiado com cada uma dessas doses. Como controle foram preparadas placas com meio M16 não irradiado.

No teste, embriões no estágio de 02 células recém coletados de fêmeas híbridas foram selecionados e depositados em cada uma das placas de meio irradiado nas diferentes doses e também nos grupos controle. As placas então foram mantidas em estufa com 5% de CO₂; 37°C e 95% HR até o momento do uso.

No cultivo, os embriões do meio que foi irradiado nas diferentes doses e os indivíduos do grupo controle foram acompanhados diariamente até o estágio de blastocisto.

4.12.3 Influência da radiação sobre o azul da Prússia no desenvolvimento embrionário *in vitro*

Para se identificar possíveis efeitos da radiação sobre os compostos, uma quantidade correspondente a 1,5 mg de azul da Prússia Alemão ou Brasileiro foi irradiada em 1mL de meio de cultivo M16 na dose de 1 Gy a uma taxa de dose de 669 KGy/h.

Após a irradiação, foram preparadas placas com 200 µL que foram equilibradas por 01 hora em estufa de CO₂ antes da deposição dos embriões. Foi preparada 01 placa controle com igual volume de meio sem AzP e não irradiado.

Em seguida, embriões de 02 células foram selecionados e depositados em cada grupo de placas para serem acompanhados em seu desenvolvimento até blastocisto.

4.12.4 Influência da radiação sobre o embrião e o seu desenvolvimento embrionário *in vitro*

Para se avaliar possíveis efeitos da radiação sobre os embriões e também poder identificar uma dose adequada ao uso para os ensaios com o azul da Prússia brasileiro e alemão, foi realizado um experimento de irradiação associado ao cultivo.

Neste experimento, antes da irradiação cerca de 25 a 30 embriões de 02 células foram alojados em palhetas para congelamento de embriões de 0,5cc (*straws*) (Figura 14) que continham meio M16 sem azul da Prússia.

Em seguida, os *straws* com os embriões foram irradiados nas doses de 01; 1,5; 04 e 500 Gy a uma taxa de dose de 739 KGy/h. Após a irradiação, os embriões foram transferidos para placas de 35 mm que continham 200 µL de meio de cultivo M16 não irradiado e sem azul da Prússia e as gotas foram cobertas com óleo mineral e mantidas em estufa de CO₂ a 5%. Como controle, foram cultivados embriões não irradiados em meio M16 normal.

Este experimento possibilitou a escolha da dose de radiação para os experimentos seguintes.



Figura 14: Palhetas ou *straws* (para congelamento de embriões)

Fonte: <https://www.prvet.com.br/palheta-025-ml-imv-c10-unidades>

4.12.5 Influência da concentração do azul da Prússia na irradiação dos embriões

Para observar a interferência do azul da Prússia na irradiação conjunta com os embriões, foi realizado um experimento no qual os embriões foram irradiados com ambos os compostos e em seguida recuperados e cultivados.

No experimento, em tubos com 01 mL de meio M16 foram depositados 0,5; 1,5 e 3mg de cada composto. Após homogeneização retirou-se 350 µL de cada tubo que foram transferidos para *straws* de 0,5 cc. Em seguida os embriões foram depositados nos *straws*, e foram irradiados nas doses de 01; 1,5; 04 e 500 Gy.

Cada *straw* recebeu entre 25 a 30 embriões de 02 células. Após a irradiação os embriões foram cultivados em placas de 35 mm com 200 µL de meio de cultivo M16 não irradiado e sem azul da Prússia em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

4.13 Experimentos *in vivo* - Implantes embrionários

Para a avaliação dos efeitos dos compostos, da radiação e do meio irradiado sobre a viabilidade dos embriões, foram realizados experimentos *in vivo*.

Nestes experimentos foram realizados implantes em fêmeas pseudoprenhes de diversos grupos conforme indicado na tabela 4. No momento do implante os embriões estavam em estágio de blastocisto inicial, por isso foram realizados pela via intrauterina e as fêmeas receptoras estavam com 2,5 dpc (dia pós coito).

A idade dos indivíduos ao implante (blastocisto) foi escolhida para que os embriões implantados tivessem ficado nas seguintes condições: 1) vários dias na presença de ambos os compostos; 2) em cultivo no meio M16 irradiados com diferentes doses e 3) após terem sido irradiados com diferentes doses na presença dos compostos.

Nos experimentos *in vivo*, as progênies obtidas destes implantes foram acompanhadas e logo pós ao desmame foram acasaladas visando identificar alterações fenotípicas.

Também para se observar possíveis danos que pudessem ter ocorrido no DNA, os acasalamentos continuaram até a terceira geração com os descendentes destas progênies, possibilitando observar alterações fenotípicas provocadas pelo AzP (Brasileiro e Alemão) e pela radiação.

Tabela 4 - Quantidades de fêmeas doadoras e receptoras por grupo de implante

Grupos dos experimentos <i>in vivo</i>	Fêmeas Doadoras	Embriões Coletados	Média de Embriões/fêmea	Fêmeas Receptoras
Implantes (embriões + AzP Brasil)	18	616	34,2	47
Implantes (embriões + AzP Alemão)				
Implantes (grupo controle)				
Implantes (embriões irradiados 1 Gy)	16	196	35	07
Implantes (grupo controle)		364		08
Implantes (embriões irradiados 1,5 Gy)				
Implantes (grupo controle)	20	679	33,9	38
Implantes (embriões + AzP Brasil + radiação)				
Implantes (embriões + AzP Alemão + radiação)				

Fonte: SALGADO, 2020

4.13.1 Implante de embriões irradiados e não irradiados, na presença e na ausência de azul da Prússia, em fêmeas receptoras pseudoprenhes

Embriões dos diferentes grupos experimentais foram implantados em fêmeas receptoras pseudoprenhes da linhagem B6C3H-F1. Os seguintes grupos foram implantados: (a) embriões cultivados com azul da Prússia Brasileiro e Alemão, (b) embriões irradiados com azul da Prússia Brasileiro e Alemão, (c) embriões irradiados sem azul da Prússia e (d) embriões não irradiados e sem AzP utilizados como controle.

No implante cada fêmea receptora recebeu de 10 a 15 embriões em mórula tardia ou blastocisto inicial, que foram implantados por via intrauterina.

Para a realização das transferências embrionárias as fêmeas foram anestesiadas com Cetamina (80-100 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg).

Os implantes foram realizados como descrito anteriormente.

Após a cirurgia, as fêmeas foram acompanhadas no pós-operatório imediato e em seguida ficaram alojadas individualmente, até a data provável do parto (dpp), aproximadamente 17 dias após o implante.

4.13.2 Acasalamentos realizados com as progênies originadas dos implantes de embriões

As fêmeas receptoras que receberam embriões dos diversos grupos tiveram a gestação acompanhada e após os partos as progênies também foram observadas até o desmame.

Os nascimentos foram registrados e a progênie avaliada até a puberdade, quando foi acasalada. O acasalamento foi realizado após uma seleção ao acaso dos machos e das fêmeas que formariam os casais.

A progênie resultante destes casais iniciais formou novos casais e isto se repetiu até a 3^o geração. Todos os nascimentos de cada uma das gerações foram avaliados e os dados registrados em planilhas.

Este protocolo foi utilizado também com as progênies do grupo controle.

4.14 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas na linguagem R (R Core Team, 2014), utilizando o R-studio (R Studio Team, 2015).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Experimentos *in vitro*

5.1.1– Cultivo *in vitro* dos embriões

São apresentados a seguir, os resultados dos cinco grupos experimentais submetidos ao cultivo.

5.1.2 Influência do azul da Prússia (AzP) no desenvolvimento embrionário *in vitro*

O cultivo *in vitro* de embriões é uma atividade exigente tanto do ponto de vista técnico, quanto das condições nas quais o embrião será mantido. O embrião é um organismo complexo e extremamente rigoroso, tornando o seu sistema bioquímico um desafio para as condições onde ele se desenvolve. Apenas condições muito bem definidas e estáveis permitem a eles se dividirem, alcançar o estágio de blastocisto e eclodirem (estágio de desenvolvimento prévio a implantação no útero materno). Por esta razão, a primeira investigação foi conduzida para se conhecer os efeitos do composto alemão e brasileiro sobre o desenvolvimento embrionário.

No experimento inicial os embriões ficaram expostos a concentrações crescentes de azul da Prússia e o desenvolvimento embrionário foi acompanhado até blastocisto (estágio máximo de desenvolvimento em estufa).

Os resultados obtidos com este grupo estão indicados na tabela 5.

Tabela 5 - Influência do azul da Prússia (AzP) sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro*

Dose AzP mg	Embrões AzP BRASILEIRO		Embrões AzP ALEMÃO		Controle (0 mg)	
	Nº embrões	Nº blastocistos	Nº embrões	Nº blastocistos		
0,007	24	24	24	24		
0,015	24	24	24	24		
0,031	24	24	24	24		
0,062	24	24	24	24		
0,125	24	24	24	20		
0,25	24	24	24	24		
0,5	24	24	24	24		
1	24	24	24	24		
1,5*	24	24	24	24		
3	24	1	24	23		
6	24	0	24	14		
					Nº embrões	Nº blastocistos
Controle (0 mg)					24	24

*A dose de 1,5 mg foi escolhida para os testes seguintes

Fonte: SALGADO, 2020

Pela tabela 5 acima, podemos observar que, quando comparado com o grupo controle, ambos os compostos não interferem no desenvolvimento dos embriões até a concentração de 1,5 mg. Doses maiores, entretanto, demonstraram haver uma diferença no comportamento de ambas as formulações, onde no acompanhamento até o estágio de blastocisto, o composto brasileiro parece ser menos favorável ao desenvolvimento que o composto alemão.

Este experimento é do tipo dose resposta, e os resultados indicam que a variação na quantidade de azul da Prússia, após a concentração de 1,5 mg, interfere no desenvolvimento embrionário (Figura15). Observamos nesta figura, por meio do modelo de log logístico com a regressão de parâmetros para os dois compostos de AzP, que há uma diferença entre eles, onde a mudança significativa na inclinação da curva de regressão, indica que o AzP brasileiro tem uma ação significativamente maior na redução de blastocistos que o alemão (3x maior). A dose letal 50 (LD50) foi de 2,31 mg para o composto brasileiro e de 6,48 mg para o alemão.

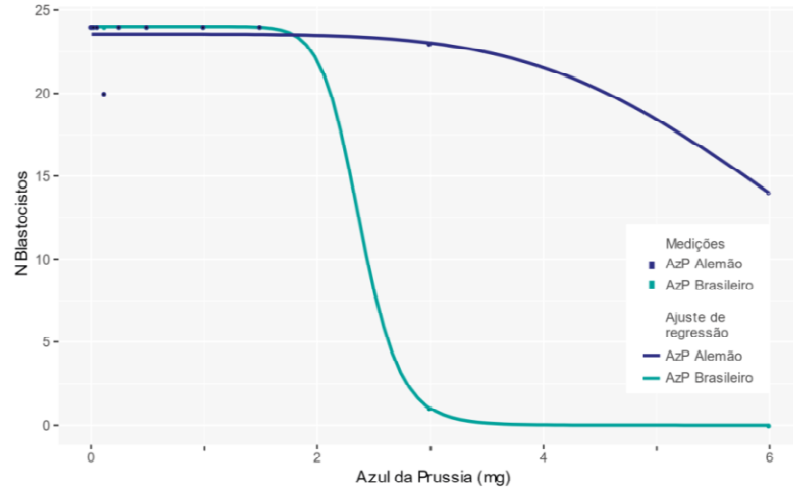


Figura 15: Curvas dose-resposta comparando o azul da Prússia (AzP) alemão e o brasileiro
Fonte: SALGADO, 2020

Uma vez observado que até a dose de 1,5 mg de AzP Brasileiro e Alemão havia o desenvolvimento embrionário, foi realizado um experimento com um número maior de embriões para cada um dos compostos. Os resultados estão indicados nas tabelas 6, 7 e 8 abaixo.

Tabela 6 - Embriões cultivados com 1,5 mg do AzP Alemão e o controle (0 mg)

Grupos	Dose AzP (mg)	Quantidade de Embriões		
		02 células	Blastocistos	Mortos
Alemão	1,5	203	183	20
Controle	0	108	104	04

Fonte: SALGADO, 2020

A análise estatística do cultivo de embriões na presença de 1,5 mg do composto alemão, revelou um valor de $\chi^2=3,7422$ com um $p=0,5305$, não significativo na comparação com o grupo controle.

Tabela 7 - Embriões cultivados com 1,5 mg do AzP Brasileiro e o controle (0 mg)

Grupos	Dose AzP (mg)	Quantidade de Embriões		
		02 células	Blastocistos	Mortos
Brasileiro	1,5	205	196	09
Controle	0	100	95	05

Fonte: SALGADO, 2020

No caso do composto brasileiro, observa-se que este também não apresentou uma diferença estatística significativa quando comparado com o grupo controle com um valor de $\chi^2=0,0571$ e um $p=0,811202$.

Tabela 8 - Comparação do AzP Alemão e Brasileiro no cultivo de embriões

Grupos	Dose AzP (mg)	Quantidade de Embriões		
		02 células	Blastocistos	Mortos
Alemão	1,5	203	183	20
Brasileiro	1,5	205	196	09

Fonte: SALGADO, 2020

Como pode ser observado na tabela 8 acima, a comparação no número de embriões que se desenvolveram na presença dos compostos Brasileiro e Alemão, revelou uma diferença significativa entre eles, com um $\chi^2=4,6086$ e um $p=0,031811$. Este resultado é também apresentado na figura 16.

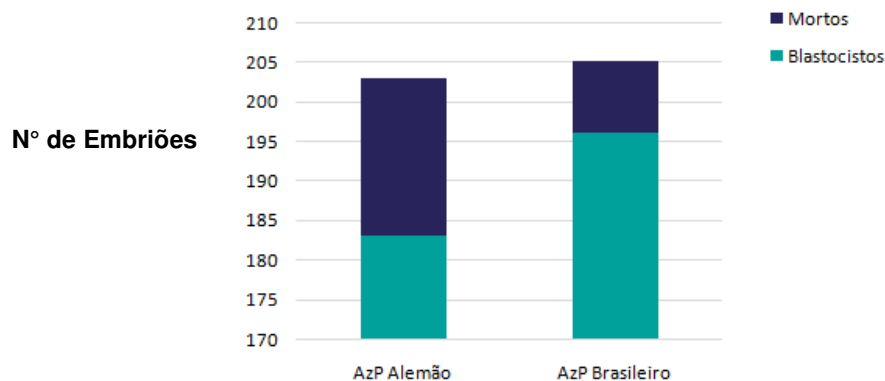


Figura 16: Embriões cultivados na presença de AzP Alemão e Brasileiro

Fonte: SALGADO, 2020

Os embriões são organismos muito sensíveis e embora tenham uma zona pelúcida relativamente resistente, ela pode sofrer efeitos de partículas que podem agredi-la.

A comparação dos compostos demonstra uma diferença importante entre as duas formulações. Enquanto o produto alemão se apresenta como um pó de cristais finos e regulares, e que quando é adicionado ao meio permite uma maior limpidez, o produto nacional é formado por cristais irregulares em sua superfície e grande quantidade de pó, quando adicionado ao meio o deixa mais turvo (Figura 17).

Embora não tenha sido investigado, é possível que as características dos cristais no produto nacional provoquem traumas na parede dos embriões alterando a sua estabilidade. Este efeito parece ter se intensificado com a adição de maiores quantidades do AzP brasileiro.

Outra interferência possível pode estar relacionada à presença de contaminantes na formulação nacional, uma vez que se observa um aumento na inibição do desenvolvimento à medida que maiores quantidades do produto são adicionadas ao meio de cultivo, como se verifica pelo padrão de curva sigmóide apresentado na figura 15. Vemos nesta figura, que pequenas variações na quantidade do AzP brasileiro causa grandes prejuízos no desenvolvimento de embriões de 02 células que chegam a blastocisto.

Os resultados obtidos com o cultivo frente a diferentes quantidades do AzP, também teve como objetivo determinar uma quantidade que fosse suficientemente grande para avaliar a influência do composto, mas que também permitisse a obtenção de embriões viáveis para os ensaios *in vivo*.

Desta forma passou-se a se considerar a dose de 1,5 mg para uso nos demais experimentos, por ser uma dose que não inibe o desenvolvimento dos embriões (Figura 18 e 19), possibilitando avaliar os efeitos dos compostos brasileiro e alemão em experimentos que envolvem a radiação e os aspectos reprodutivos.

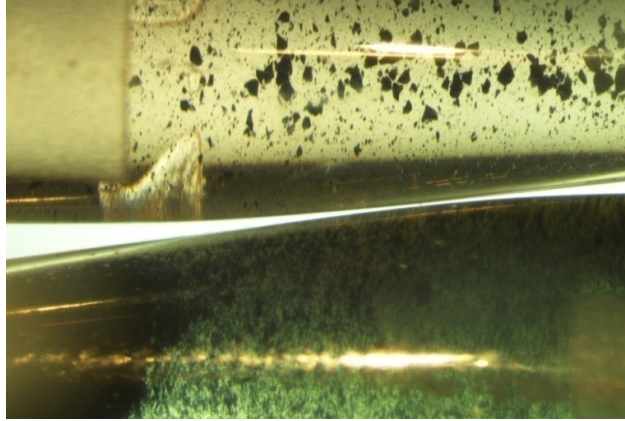


Figura 17: Azul da Prússia Alemão (em cima) e Brasileiro (em baixo)
Fonte: SALGADO, 2020

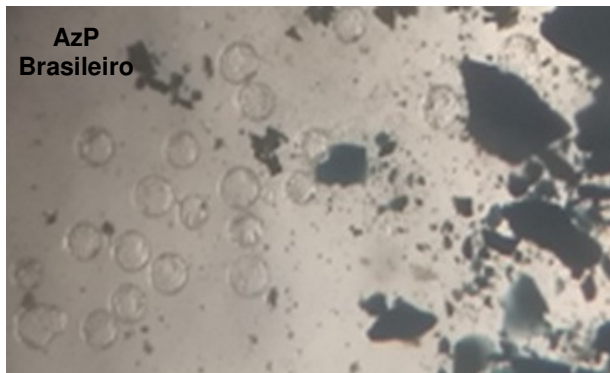


Figura 18: Embriões desenvolvidos no AzP Brasileiro (Blastocistos)
Fonte: SALGADO, 2020

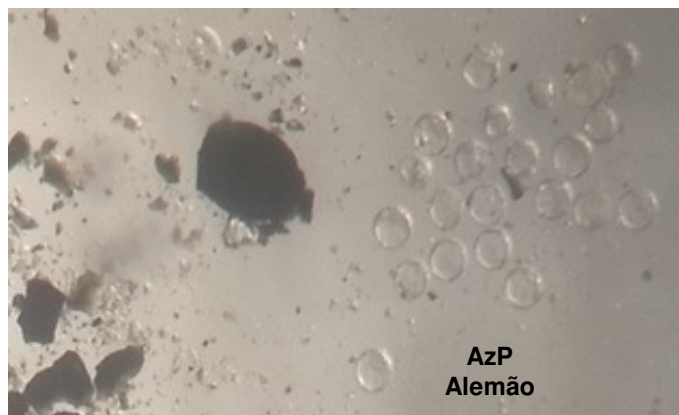


Figura 19: Embriões desenvolvidos no AzP Alemão (Blastocistos)
Fonte: SALGADO, 2020

5.1.3 Influência da radiação ionizante sobre o meio de cultivo M16 no desenvolvimento embrionário *in vitro*

Após os experimentos demonstrando que os embriões se desenvolviam na presença do azul da Prússia nacional e alemão, realizamos um teste para identificar se o meio de cultivo quando irradiado, influenciaria no desenvolvimento de embriões não irradiados.

Para investigar esta hipótese, amostras de meio (M16) foram irradiadas nas doses de 1; 1,5 e 4 Gy e posteriormente receberam embriões de duas células não irradiados, que foram acompanhados em seu desenvolvimento e comparados com o grupo controle formado por meio não irradiado.

Os resultados podem ser observados na tabela 9.

Tabela 9 - Influência da radiação ionizante sobre o meio de cultivo M16

Dose da Radiação (Gy)	Meio Irradiado			Controle Meio não irradiado (0 Gy)		
	Nº embriões	Nº blastocistos	Prop.	Nº embriões	Nº blastocistos	Prop.
1	36	29	0,81	34	33	0,97
1,5	20	18	0,90	20	20	1,00
4	16	8	0,50	16	15	0,94

Fonte: SALGADO, 2020

Pela tabela 9, observamos que a irradiação nas doses de 1; 1,5 e 4 Gy conduziu a um desenvolvimento embrionário de 0,81; 0,90 e 0,50 respectivamente. No grupo controle, para estas doses foi observado um desenvolvimento de 0,97; 100 e 0,94.

Esses dados demonstram que o aumento da dose reduz o desenvolvimento embrionário. Este experimento é do tipo dose resposta e a variação das doses alterou a qualidade do meio, interferindo na capacidade dele permitir o desenvolvimento embrionário (Figura 20).

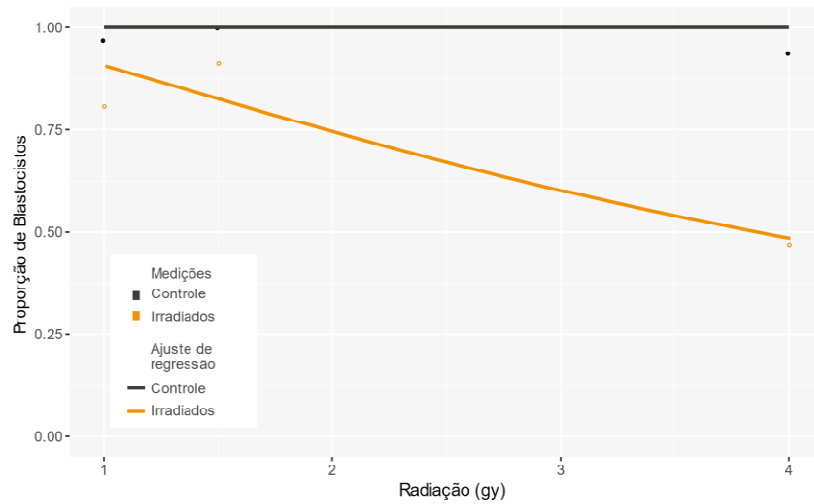


Figura 20: Curvas dose-resposta do meio de cultivo M16 influenciando na formação de blastocistos

Fonte: SALGADO, 2020

Considerando o desenvolvimento embrionário no meio não irradiado (controle) e no meio irradiado com as diferentes doses, para os resultados obtidos o modelo de melhor ajuste foi o log logístico de 2 parâmetros. Comparando os parâmetros das regressões dos irradiados e do controle através de ANOVA, observa-se uma diferença significativa na inclinação da regressão, indicando que os embriões em meio irradiado são afetados significativamente diferente do controle. A dose letal 50 (LD50) estimada por este modelo para os embriões em meio irradiado foi de 4,15 Gy.

A análise estatística realizada com a dose de 1,5 Gy, comparando o meio irradiado com o meio não irradiado (controle), indicou que nesta dose não há diferença significativa ($x^2=2,0$ e $p>0,05$). Paralelamente, na comparação com o meio irradiado com 4 Gy, a diferença de resposta com o grupo controle foi significativa com $x^2=7,57$ e um $p=0,015$.

Esses resultados indicaram que a dose de 1,5 Gy poderia ser utilizada para os outros experimentos envolvendo o cultivo dos embriões, uma vez que esta dose traria menor comprometimento aos indivíduos possibilitando a sua observação.

5.1.4 Influência da radiação sobre o azul da Prússia impactando no desenvolvimento embrionário *in vitro*

Após observar que o meio irradiado não impossibilitou por completo o desenvolvimento dos embriões, realizamos um experimento irradiando o meio na presença do composto AzP Brasileiro e Alemão.

O objetivo foi determinar se o AzP quando irradiado sofreria modificações que comprometessem o cultivo e o desenvolvimento embrionário. Assim, o meio com 1,5 mg do composto brasileiro e alemão foi irradiado na dose de 1Gy e taxa de dose de 669 KGy/h. Em seguida embriões de duas células não irradiados foram cultivados neste meio e o seu desenvolvimento foi comparado com o grupo controle.

Na tabela 10 podemos observar que no composto produzido no Brasil, 90% dos embriões se desenvolveram, contra 100% observado no composto Alemão e no grupo controle.

Tabela 10 - Influência da radiação sobre o azul da Prússia

Meio com AzP Brasileiro			Meio com AzP Alemão			Controle		
1,5 mg e 1 Gy			1,5 mg e 1 Gy			0 mg AzP e 0 Gy		
Nº embriões	Nº blastocistos	Prop	Nº embriões	Nº blastocistos	Prop	Nº embriões	Nº blastocistos	Prop
20	18	0,9	20	20	1	18	18	1

Fonte: SALGADO, 2020

O resultado obtido demonstra que a radiação do meio de cultivo com 1 Gy, na presença de 1,5 mg do azul da Prússia, não alterou as suas características, possibilitando o cultivo dos embriões.

A análise estatística comparando os dois compostos com o grupo controle não resultou em diferença significativa ($\chi^2=3,94$ e $p=0,14$). Também não se observou diferença na comparação entre o composto brasileiro e alemão entre si, com um $\chi^2=0,53$ e $p=0,47$.

Os resultados mostram que o azul da Prússia quando irradiado, não impede o desenvolvimento embrionário.

Estes resultados sugerem ainda que os compostos atuaram como quelante na remoção de subprodutos formados na irradiação do meio de cultivo.

5.1.5 Influência da radiação sobre o embrião e o seu desenvolvimento embrionário *in vitro*

Com o objetivo de observar os efeitos da radiação nos embriões, foi realizado um experimento preliminar onde eles foram irradiados e em seguida cultivados em meio não irradiado e sem azul da Prússia. Os resultados obtidos demonstraram que quando comparados com os grupos controle, os embriões irradiados nas doses de 1; 1,5; 4 e 500 Gy, apresentaram taxas de desenvolvimento diferentes, conforme pode ser observado na tabela 11 a seguir.

Tabela 11 - Efeito da radiação sobre o embrião e seu desenvolvimento *in vitro*

Dose de radiação (Gy)	Embriões Irrradiados		Grupo Controle (0 Gy)	
	Nº embriões	Nº blastocistos	Nº embriões	Nº blastocistos
1	25	17	25	23
1,5	25	18		
4	25	6	25	19
500	25	0		

Fonte: SALGADO, 2020

Neste experimento, a comparação dos irradiados com o controle não resultou em diferença nas doses de 1 e 1,5 Gy ($\chi^2=2,17$; $p=0,14$). Contudo, resultou em diferença significativa para a irradiação com 4 Gy ($\chi^2=11,52$; $p=0,00$).

Pela figura 21 abaixo, podemos observar que o efeito da radiação na formação de blastocisto obedece a uma curva dose-resposta, onde a inclinação foi significativamente maior para os irradiados.

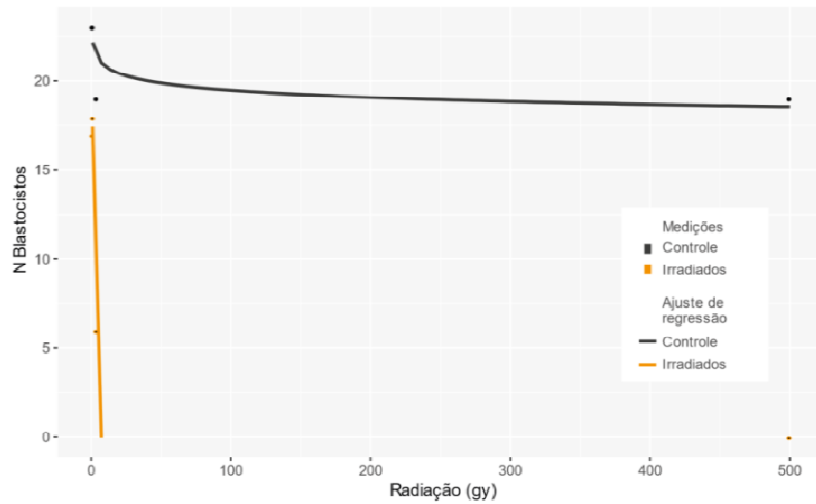


Figura 21: Curvas dose-resposta do efeito da radiação nos embriões
Fonte: SALGADO, 2020

Os resultados obtidos com esse experimento demonstram que a radiação exerce grande influência sobre os embriões. O aumento da dose aumenta consideravelmente a mortalidade dos indivíduos.

A letalidade da radiação em doses mais elevadas é bastante conhecida. Porém, parte importante deste estudo era a identificação de uma dose de radiação que permitisse avaliar os efeitos do AzP em uso conjunto com embriões irradiados. Desta forma, considerou-se as doses de 1 Gy e 1,5 Gy para os testes com o azul da Prússia.

A partir do experimento preliminar foi conduzido um teste com um número maior de embriões.

Na tabela 12 abaixo indicamos os efeitos da radiação nas doses de 1 Gy e 1,5 Gy empregando um número maior de embriões. Estes embriões foram posteriormente utilizados nos experimentos *in vivo*.

Tabela 12 - Embriões Irradiados com 1 Gy e 1,5 Gy

Grupos	Dose Radiação (Gy)	Quantidade de Embriões			
		02 células	Blastocistos	Mortos	% Blastocistos
Embriões Irradiados	1	98	70	28	71,4
Embriões Irradiados	1,5	264	173	91	65,5

Fonte: SALGADO, 2020

Os dados da tabela 12 apresentam o desenvolvimento embrionário para as doses de 1 Gy e 1,5 Gy, com um número maior de embriões. Os valores indicam não haver uma diferença significativa no desenvolvimento embrionário entre estas doses.

Os resultados obtidos neste experimento demonstram que a radiação exerce influência sobre os embriões, que o aumento da dose aumenta a mortalidade dos indivíduos e que a dose de 1,5 Gy poderia ser utilizada para se investigar os efeitos do azul da Prússia sobre embriões irradiados.

5.1.6 Influência do azul da Prússia em diferentes concentrações e doses de irradiação

Para este experimento, embriões foram irradiados com 1; 1,5; 4 e 500 Gy na presença de 0,5; 1,5 e 3 mg de azul da Prússia brasileiro e alemão. Os resultados podem ser observados na tabela 13.

Tabela 13 - Concentrações de AzP brasileiro e alemão e diferentes doses de irradiação

Influência da concentração do Azul da Prússia na irradiação dos embriões								
AzP Brasileiro				Controle 0mg - Gy		X - squared		
AzP (mg)	Dose Gy	Vivos	Mortos	Vivos	Mortos	X ²	Valor-p	
0,5	1	18	7	24	1	5,3571	0,020638	Significativo
1,5	1	20	5	24	1	3,0303	0,081723	Não Significativo
3	1	0	25	24	1	42,32	<0,0001	Significativo
1,5	1,5	22	3	24	1	1,087	0,297147	Não Significativo
1,5	4	0	25	24	1	42,32	<0,0001	Significativo
1,5	500	0	25	24	1	42,32	<0,0001	Significativo
AzP Alemão								
AzP Alemão				Controle 0mg - Gy		X - squared		
AzP (mg)	Dose Gy	Vivos	Mortos	Vivos	Mortos	X ²	Valor-p	
0,5	1	20	5	24	1	3,0303	0,081723	Não Significativo
1,5	1	20	5	24	1	3,0303	0,081723	Não Significativo
3	1	0	25	24	1	42,32	<0,0001	Significativo
1,5	1,5	22	3	24	1	1,087	0,297147	Não Significativo
1,5	4	0	25	24	1	42,32	<0,0001	Significativo
1,5	500	0	25	24	1	42,32	<0,0001	Significativo

Fonte: SALGADO, 2020

Os embriões irradiados com 1 Gy e 0,5 mg do AzP brasileiro, apresentaram um $\chi^2=5,3571$, com $p=0,020638$, sendo significativo na comparação com o grupo controle. Porém no AzP para 1,5 mg, conduziu a um $\chi^2=3,0303$, com $p=0,081723$, não significativo se comparado com o grupo controle. Já o aumento para 3 mg do AzP, não permitiu o desenvolvimento ($\chi^2=42,32$ e $p< 0,0001$). Este resultado corrobora achados anteriores onde o AzP brasileiro nesta concentração não permitiu o desenvolvimento mesmo sem a irradiação como mostrado na tabela 4.

No caso do uso de 0,5 mg e 1,5 mg do AzP alemão e a irradiação com 1Gy, não se observa diferença com o controle onde encontramos um valor de $\chi^2=3,0303$ e $p=0,081723$ para as duas concentrações. Contudo, embora anteriormente o AzP alemão com 3 mg não tenha interferido no cultivo não irradiado (tabela 4), quando irradiado nesta concentração ele inibiu o desenvolvimento ($\chi^2=42,32$ e $p<0,0001$), sugerindo que a partir de 3 mg há prejuízo no desenvolvimento na comparação com o controle não irradiado.

Já o AzP brasileiro e alemão com 1,5 mg e dose de 1,5 Gy, não apresentaram diferença com o controle com $\chi^2=1,087$ e $p=0,297147$ para os dois compostos.

Nas doses de 4 Gy e 500 Gy e concentração de 1,5 mg, há uma diferença significativa na comparação com o grupo controle, com um $\chi^2=42,32$ e um $p<0,0001$ para ambos compostos e nas duas doses utilizadas.

A partir destes resultados, realizamos ensaios com 1,5 Gy e 1,5 mg de AzP, afim de se avaliar a influência do composto na proteção aos embriões irradiados.

Os resultados estão indicados na tabela 14 e na figura 22 abaixo:

Tabela 14 - Embriões irradiados com 1,5 Gy na presença e na ausência do AzP

	Irradiado (1,5 Gy)	AzP Alemão (1,5 Gy + 1,5 mg)	AzP Brasileiro (1,5 Gy + 1,5 mg)	Controle (0Gy e 0mg)
Embriões 02 Células	264	245	234	100
Blastocistos	173	240	221	99
Mortos	91	5	13	1

Fonte: SALGADO, 2020

O grupo de embriões irradiados sem o composto e o grupo de embriões irradiados juntamente com o AzP brasileiro e alemão, apresentaram uma diferença significativa, demonstrando uma participação do AzP na redução da mortalidade dos embriões. Na comparação entre os irradiados sem o composto e os irradiados com o AzP alemão, observamos um $\chi^2=87,323$ com $p<0,0001$ significativo. Entre AzP brasileiro e os embriões irradiados sem o AzP, um $\chi^2=62,768$ e $p<0,0001$ significativo. Por fim, na estatística comparando os dois compostos entre si, observamos um $\chi^2=4,08$ com $p=0,0431$, também significativo, porém de menor inferência.

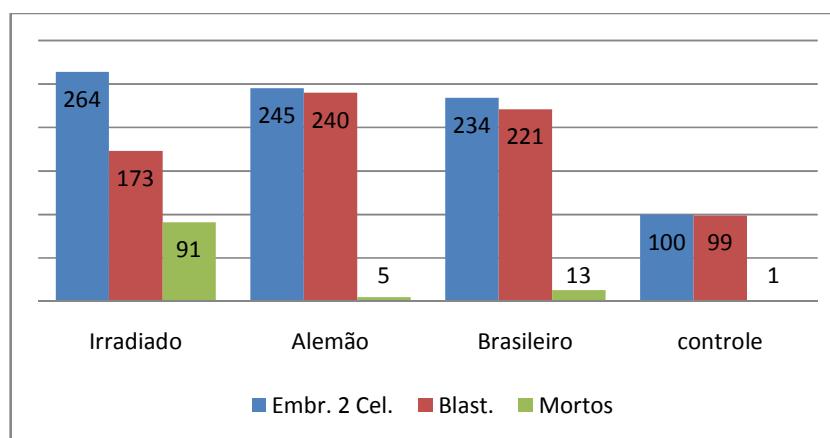


Figura 22: Embriões irradiados na presença e na ausência do AzP
Fonte: SALGADO, 2020

Os resultados observados com 1,5 Gy e 1,5 mg do produto, demonstram que o AzP, reduz a mortalidade, indicando uma proteção e abrindo a possibilidade de novas investigações.

5.2 *In vivo* – Implante embrionário

Para a investigação de efeitos do Azul da Prússia brasileiro e alemão: a) sobre os embriões; b) da radiação sobre eles e c) da radiação na presença do azul da Prússia, com e sem embriões, os indivíduos destes ensaios foram implantados em fêmeas receptoras. As características reprodutivas observadas nas fêmeas reprodutoras e os fenótipos das progênes, somente poderiam ser investigados em experimentos *in vivo*.

Serão apresentados a seguir os resultados dos grupos experimentais que foram submetidos aos implantes.

5.2.1 Implante de embriões desenvolvidos na presença do azul da Prússia em fêmeas receptoras pseudoprenhes

Implantes via intrauterina com embriões cultivados até blastocistos na presença de 1,5 mg do AzP brasileiro e alemão e em meio M16 sem AzP, (grupo controle) estão apresentados na tabela 15 abaixo.

Tabela 15 - Implantes de embriões no estágio de blastocistos, desenvolvidos na presença de AzP brasileiro e alemão 1,5 mg, em fêmeas receptoras pseudoprenhes e implantes do grupo controle, embriões desenvolvidos sem AzP

Grupos <i>In vivo</i>	Nº de fêmeas e implantes	Média de embriões/ ♀	Nº Total Partos	Nº Total Filhotes	Nº Total Anomalias
AzP BRASILEIRO (1,5 mg)	13	15	4	25	0
CONTROLE (0 mg)	10	10	7	33	0
AzP ALEMÃO (1,5 mg)	15	12	5	23	0
CONTROLE (0 mg)	9	11	5	28	0

Fonte: SALGADO, 2020

De um total de 13 fêmeas implantadas com embriões cultivados com azul da Prússia brasileiro, 04 ficaram prenhes, com um $\chi^2=3,4862$ e um $p=0,1049$ não significativo quando comparado com o grupo controle. Para o AzP alemão, de 15 fêmeas implantadas, 05 engravidaram indicando um $\chi^2=1,1429$ e um $p=0,4103$. Os resultados também demonstraram não haver uma diferença significativa no percentual de prenhes na comparação com os dois compostos entre si ($\chi^2=0,020993$ e $p=1$).

Estes resultados demonstram que o AzP não interferiu com a capacidade das fêmeas manterem a gestação após o implante dos embriões. Contudo, uma comparação entre número de partos e o número de filhotes, sugere haver uma proporção maior de filhotes dos implantes do AzP brasileiro em relação ao alemão. A comparação com o χ^2 leva a um resultado significativo ($\chi^2=9,1629$ e $p=0,0029999$). Os dados podem ser observados na figura 23.

É possível que composto alemão, por ser mais fino, adira mais à zona pelúcida e interfira com a nidação dos embriões (Figuras 17, 18 e 19).

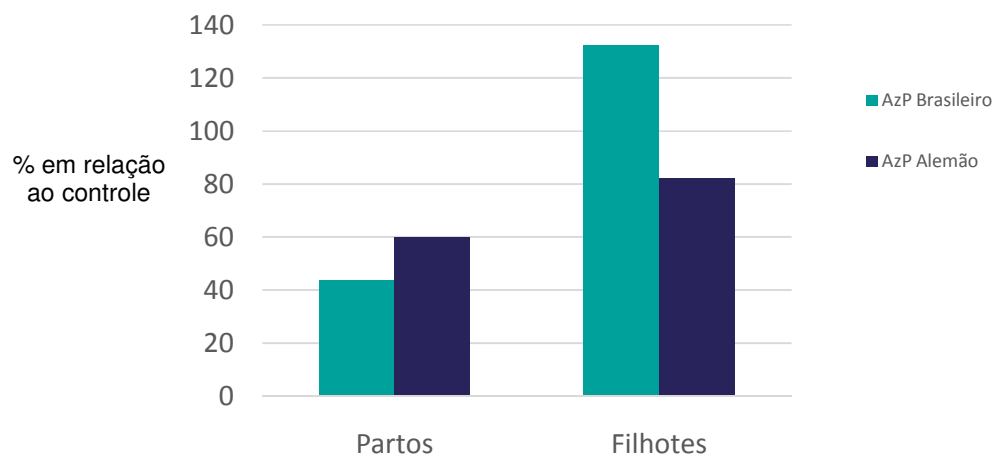


Figura 23: Relação de número de partos e filhotes nascidos, dos blastocistos (embriões) implantados na presença de AzP brasileiro e alemão

Fonte: SALGADO, 2020

5.2.2 Implante de embriões irradiados com 1,5 mg de azul da Prússia (AzP) em fêmeas receptoras pseudoprenhes

Os resultados dos implantes com embriões que foram irradiados com 1,5 Gy na presença de AzP alemão e brasileiro (1,5 mg), e os implantes com os embriões do grupo controle não irradiados e cultivados em meio M16 sem AzP, estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16 - Implantes de blastocistos em fêmeas receptoras pseudoprenhes (embriões de 02 células, que foram irradiados (1,5 Gy) na presença de AzP (1,5 mg de brasileiro e alemão) e implantes do grupo controle, embriões desenvolvidos em meio M16

Grupos <i>In vivo</i>	Nº de fêmeas e implante	Média de embriões/ ♀	Nº Total Partos	Nº Total Filhotes	Nº Total Anomalias
AzP BRASILEIRO (1,5 mg e 1,5 Gy)	11	15	5	18	0
CONTROLE (0 mg e Gy)	7	14	4	25	0
AzP ALEMÃO (1,5 mg e 1,5 Gy)	12	15	2	5	0
CONTROLE (0 mg e Gy)	8	12	4	29	0

Fonte: SALGADO, 2020

Os resultados obtidos com os implantes de embriões irradiados na presença do azul da Prússia brasileiro e alemão, não demonstraram diferença ($\chi^2= 0,23377$ e $p=1$) na comparação entre o número de partos dos implantes com o AzP nacional e o grupo controle.

Na comparação entre os compostos com relação ao número de partos, também não foi significativa a diferença, revelando um $\chi^2=2,2465$ e $p=0,1829$.

Contudo, com relação ao tamanho médio da ninhada, o número de nascimentos por fêmea foi significativamente diferente na comparação entre os grupos de ambos os compostos e o controle.

Com o composto brasileiro, as fêmeas que receberam os embriões irradiados juntamente com ele pariram em média 3,6 neonatos por parto contra 6,25 no grupo controle.

Também no grupo de implante dos embriões irradiados na presença do AzP alemão foi observada uma diferença importante onde o tamanho médio de ninhada deste grupo (2,5 neonatos por fêmea) foi significativamente diferente do controle que apresentou 6,6 neonatos em média.

Contudo os resultados indicam haver uma diferença significativa na comparação entre o número de filhotes nascidos na presença de AzP brasileiro e alemão quando comparado entre si, onde o número de nascimentos é maior no grupo tratado com o composto brasileiro ($\chi^2=6,6835$ e $p=0,00995$).

Avaliando as proporções, parece haver uma proporção maior de partos e filhotes dos implantes do AzP brasileiro em relação ao alemão. A comparação destas proporções leva a um χ^2 significativo para os partos com um $\chi^2=19,549$ e $p=0,0004998$; e para os filhotes com um $\chi^2=6,2609$ e $p=0,01549$ (Figura 24).

Esses resultados confirmam os achados de outros ensaios que demonstram que a irradiação influencia na capacidade das fêmeas gestarem como também na taxa de nascimentos.

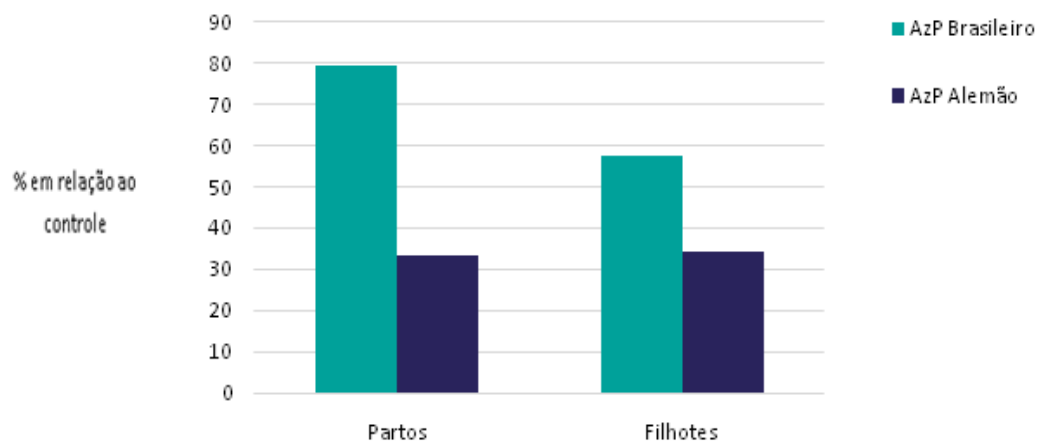


Figura 24: Número de partos e filhotes nascidos de embriões (irradiados na presença de AzP alemão e brasileiro) que desenvolveram até blastocistos, e foram implantados em fêmeas receptoras pseudoprenhes

Fonte: SALGADO, 2020

5.2.3 Implante de embriões irradiados com 1 Gy e 1,5 Gy em fêmeas receptoras pseudoprenhes

Os implantes via intrauterina de embriões irradiados com 1 e 1,5 Gy e os implantes com embriões desenvolvidos em meio M16 normal, estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17 - Quantidades de implantes realizados em fêmeas receptoras pseudoprenhes, com embriões irradiados e desenvolvidos até blastocistos

Grupos <i>in vivo</i>	Nº de fêmeas e implantes	Média de embriões/ ♀	Nº Total Partos	Nº Total Filhotes	Nº Total Anomalias
Dose da radiação 1 Gy	4	15	1	6	1
CONTROLE 0 Gy	3	15	2	5	0
Dose da radiação 1,5 Gy	6	15	1	3	1
CONTROLE 0 Gy	2	15	1	7	0

Fonte: SALGADO, 2020

Nos experimentos em que os embriões foram irradiados juntamente com o composto brasileiro e alemão, não foram detectadas anomalias ou alterações no fenótipo. Contudo, os resultados observados nos implantes de embriões que foram previamente irradiados com as doses de 1 e 1,5 Gy sem a presença do AzP alemão ou brasileiro, demonstram o nascimento de animal com anoftalmia (inexistência de globo ocular) em ambas as doses (Figura 25).

Estes resultados sugerem que na organogênese do olho durante o desenvolvimento embrionário, a radiação interferiu e provocou uma alteração no fenótipo que pode ser somática ou germinativa, sendo que neste caso seria transmitida a futuras gerações (RONDÓN, 2016; MATTHEWS, 2016).

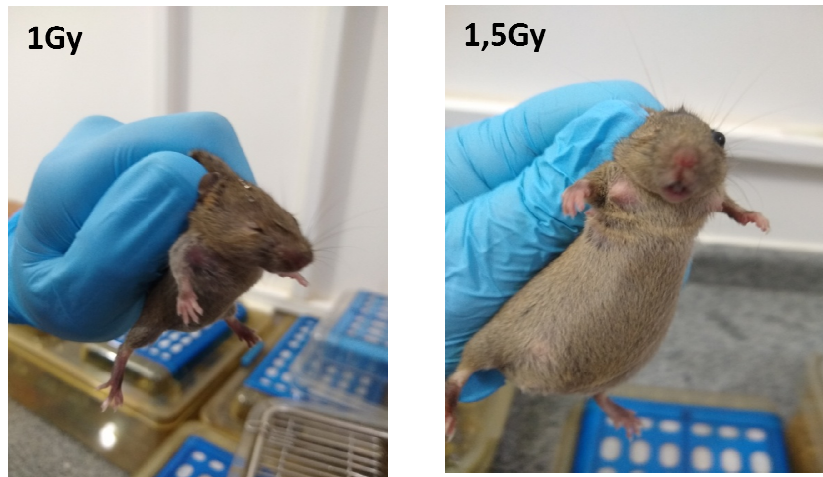


Figura 25: Anoftalmia em fêmeas nascidas de implantes de embriões irradiados com 1 Gy e 1,5 Gy

Fonte: SALGADO, 2020

5.2.4 Acasalamentos realizados com as progênie originadas dos implantes de embriões

Para se avaliar possíveis alterações genéticas que poderiam existir nos embriões dos grupos *in vitro* e *in vivo*, os filhotes originados com os implantes foram acasalados ao acaso logo após o desmame com 21 dias de idade.

Foi formado 01 casal do primeiro parto de cada geração de cada grupo experimental a saber: cultivado com AzP; Irradiado sem AzP; irradiado com AzP e grupo controle. Posteriormente, a progênie resultante destes acasalamentos foi também acasalada, assim como a sua descendência até a 3º geração. Os primeiros casais foram formados com as progênies obtidas de embriões recuperados do cultivo com os compostos brasileiro e alemão e implantados e dos embriões que sobreviveram à irradiação e que também nasceram após terem sido implantados.

Os resultados obtidos para os parâmetros: a) tamanho médio da ninhada (quantidade de filhotes nascidos); b) tempo em semanas do acasalamento até o primeiro parto (descontadas as 03 semanas da idade dos pais no primeiro nascimento) e c) observação de alterações fenotípicas, estão apresentados a seguir.

Os animais que apresentaram alterações no fenótipo foram acasalados de maneira programada.

5.2.5 Resultados dos acasalamentos realizados com as progênes originadas dos implantes de embriões do grupo controle (cultivo em meio M16 sem AzP)

Os resultados obtidos com as progênes originadas a partir do grupo controle e que foram acasaladas e acompanhadas por três gerações, estão demonstrados na tabela 18.

Tabela 18- Casal acompanhado até a terceira geração, grupo controle (embriões cultivados sem tratamento)

Casal formado dos embriões implantados sem tratamento						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
03/01/2018	24/01/2018	26/02/2018	09	04	05	5,3
1º Geração dos implantes						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
26/02/2018	19/03/2018	30/04/2018	07	04	03	5,7
2º Geração dos implantes						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
30/04/2018	21/05/2018	27/06/2018	11	07	04	5,4
3º Geração dos implantes						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
27/06/2018	18/07/2018	22/08/2018	09	04	05	5,1

**Estimado retirando 03 semanas da idade dos pais no primeiro nascimento

Fonte: SALGADO, 2020

Neste grupo, no intervalo de 03 gerações, considerando o primeiro parto de cada geração, foram obtidos 36 filhotes com uma média de 09 filhotes por parto, 5,4 semanas para o 1º parto e nenhum caso de alteração fenotípica.

5.2.6 Resultados dos acasalamentos realizados com as progênes originadas dos implantes de embriões cultivados na presença do azul da Prússia Brasileiro e Alemão

A partir dos nascimentos originados com os implantes de ambos os compostos (Tabela 15), foram formados os casais que originariam as progênes que seriam acompanhadas por 03 gerações.

Em nenhum dos grupos foi observado alterações fenotípicas nas progênes, tanto na primeira geração, quanto nas posteriores. Os parâmetros reprodutivos considerados podem ser observados nas tabelas 19 e 20.

Tabela 19 – Casal acompanhado até a terceira geração (embriões cultivados na presença de azul da Prússia Brasileiro)

Casal formado dos embriões cultivados com AzP Brasileiro						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
03/01/2018	24/01/2018	05/03/2018	07	03	04	5,8
1º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
05/03/2018	26/03/2018	07/05/2018	07	02	05	6,1
2º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
07/05/2018	28/05/2018	10/07/2018	06	04	02	6,3
3º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
10/07/2018	31/07/2018	10/09/2018	05	03	02	6,0

**Estimado retirando 03 semanas da idade dos pais no primeiro nascimento

Fonte: SALGADO, 2020

Como pode ser observado, no grupo tratado com o composto brasileiro (Tabela 19 acima), foram obtidos 25 filhotes. Com relação aos parâmetros reprodutivos considerando-se as três primeiras gerações (primeiro parto de cada

geração), foi observada uma média de 6,2 filhotes por parto e 6,1 semanas de intervalo para o 1º parto.

Com relação aos resultados observados com os implantes de embriões cultivados na presença da Radiogardase® (grupo alemão), foram obtidos 25 filhotes considerando-se as três primeiras gerações (primeiro parto de cada geração), com uma média de 6,2 filhotes por parto e 6,1 semanas de intervalo para o 1º parto (Tabela 20).

Tabela 20 – Casal acompanhado até a terceira geração (embriões cultivados na presença de azul da Prússia Alemão)

Casal formado dos embriões cultivados com AzP Alemão						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
03/01/2018	24/01/2018	04/03/2018	06	03	03	5,7
1º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
04/03/2018	25/03/2018	08/05/2018	07	02	05	6,4
2º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
08/05/2018	29/05/2018	11/07/2018	05	02	03	6,3
3º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
11/07/2018	01/08/2018	12/09/2018	07	03	04	6,1

**Estimado retirando 03 semanas da idade dos pais no primeiro nascimento

Fonte: SALGADO, 2020

5.2.7 Resultados dos acasalamentos realizados com as progênes originadas dos implantes de embriões irradiados na presença de AzP brasileiro e alemão

As progênes obtidas dos implantes de embriões irradiados na presença dos compostos brasileiro e alemão, não revelaram alterações fenotípicas até a 3º

geração. Com relação às questões reprodutivas, elas podem ser analisadas nas tabelas 21 e 22.

Tabela 21 – Casal acompanhado até a terceira geração (embriões irradiados na presença de azul da Prússia Brasileiro)

Casal formado dos embriões irradiados na presença do AzP Brasileiro						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
24/11/2018	15/12/2018	22/01/2019	07	03	04	5,7
1º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
22/01/2019	12/02/2019	24/03/2019	09	04	05	5,8
1º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
24/03/2019	14/04/2019	25/05/2019	07	04	03	6,0
1º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
25/05/2019	15/06/2019	22/07/2019	05	02	03	5,4

**Estimado retirando 03 semanas da idade dos pais no primeiro nascimento

Fonte: SALGADO, 2020

As progênie originadas dos casais formados com implantes de embriões irradiados juntamente com o AzP brasileiro, geraram 28 filhotes nas três gerações (primeiro parto de cada geração). Quanto aos parâmetros reprodutivos, foi observada uma média de 07 filhotes por parto e 5,7 semanas de intervalo para o 1º parto.

Com relação aos resultados coletados com os casais formados a partir dos implantes de embriões que foram irradiados na presença da Radiogardase® (formulação alemã), como pode ser observado na tabela 22, foram obtidos 27 filhotes considerando-se o primeiro parto de cada geração e um total de 03 gerações. Com relação aos parâmetros reprodutivos, os casais apresentaram em média 6,8 filhotes por parto e um intervalo de 5,9 semanas até o 1º parto.

Tabela 22 – Casal acompanhado até a terceira geração (embriões irradiados na presença de azul da Prússia Alemão)

Casal formado dos embriões irradiados na presença do AzP Alemão						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
29/12/2018	19/01/2019	28/02/2019	06	03	03	5,8
1º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
28/02/2019	21/03/2019	03/05/2019	07	05	02	6,2
2º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
03/05/2019	24/05/2019	02/07/2019	08	03	05	5,7
3º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
02/07/2019	23/07/2019	01/09/2019	06	03	03	5,8

**Estimado retirando 03 semanas da idade dos pais no primeiro nascimento

Fonte: SALGADO, 2020

5.2.8 Resultados dos acasalamentos realizados com as progênes originadas dos implantes de embriões irradiados com 1 e 1,5 Gy

As progênes de fêmeas implantadas com embriões irradiados com 1 e 1,5 Gy, foram acasaladas e acompanhadas até a 3º geração, tabelas 23 e 24 (1,5 Gy) e tabelas 25, 26 e 27 (1 Gy). A comparação do tamanho médio da ninhada não apresentou resultados que sugerissem alterações na capacidade dos animais se reproduzirem.

Do grupo de implantes com fêmeas que recebeu embriões irradiados, tanto com 1 Gy, como com 1,5 Gy, foi observado um animal de cada grupo, com anoftalmia conforme demonstrados na figura 25.

5.2.8.1 Resultados dos acasalamentos realizados com as progênies originadas dos implantes de embriões irradiados com 1,5 Gy

Na tabela 23 estão apresentados os dados observados com o grupo onde os embriões foram irradiados com 1,5 Gy e sem a proteção dos compostos. Este casal originou as 03 gerações seguintes e foi formado com a fêmea que nasceu com anoftalmia. O total de crias obtidas com este grupo, considerando-se o primeiro parto de cada geração, foi de 26 filhotes nas 03 gerações. A média observada foi de 6,5 filhotes por parto em um período de 5,9 semanas para o 1º parto.

Tabela 23 – Casal formado por embriões irradiados: ♂ fenótipo **normal** x ♀ fenótipo com **anoftalmia (1,5 Gy)**. Descendentes acompanhados até a terceira geração

Casal ♂ irradiado x ♀ irradiada com anoftalmia (1,5 Gy)						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
22/12/2018	12/01/2019	22/02/2019	07	02	05	6,0
1º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
22/02/2019	15/03/2019	21/04/2019	08	02	06	5,4
2º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
21/04/2019	12/05/2019	24/06/2019	06	03	03	6,2
3º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
24/06/2019	15/07/2019	27/08/2019	05	01	04	6,2

**Estimado retirando 03 semanas da idade dos pais no primeiro nascimento

Fonte: SALGADO, 2020

Os resultados observados a partir do acasalamento entre um macho não irradiado e uma fêmea nascida do implante de embriões irradiados com 1,5 Gy, demonstraram que a progênie obtida tinha fenótipo normal.

Este casal produziu em 03 gerações, um total de 26 filhotes, com uma média obtida com os nascimentos do primeiro parto de cada geração, igual a 6,5

filhotes por parto e um intervalo de 5,6 semanas para o 1º parto, conforme tabela 24.

Tabela 24 - Casal: ♂ não irradiado X ♀ irradiada com 1,5 Gy, acompanhado até a terceira geração

Casal ♂ <u>não</u> irradiado x ♀ irradiada com 1,5 Gy						
Nascimento ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
22/12/2018	12/01/2019	13/02/2019	04	02	02	4,7
1º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
13/02/2019	07/03/2019	14/04/2019	06	04	02	5,6
2º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
14/04/2019	05/05/2019	16/06/2019	09	02	07	6,1
3º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
16/06/2019	07/07/2019	16/08/2019	07	05	02	5,8

**Estimado retirando 03 semanas da idade dos pais no primeiro nascimento

Fonte: SALGADO, 2020

5.2.8.2 Resultados dos acasalamentos realizados com as progênies originadas dos implantes de embriões irradiados com 1 Gy

Também neste grupo, onde os embriões foram submetidos a 1 Gy de radiação sem a proteção dos compostos, o casal que deu origem para se acompanhar as próximas três gerações, foi composto pela fêmea que nasceu com alteração fenotípica, anoftalmia.

Pela Tabela 25 abaixo, podemos observar que nas 03 gerações foram produzidos 23 filhotes considerando-se os nascimentos observados no primeiro parto durante 03 gerações sucessivas. Com relação ao tamanho médio da ninhada, foi encontrado um valor igual a 5,7 filhotes por parto com um intervalo de 6,0 semanas para o 1º parto.

Tabela 25 – Casal: ♂ irradiado X ♀ irradiada com anoftalmia (1 Gy), acompanhado até a terceira geração

Casal ♂ irradiado x ♀ irradiada com anoftalmia (1 Gy)						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
23/06/2018	14/07/2018	20/08/2018	06	04	02	5,4
1º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
20/08/2018	10/09/2018	27/10/2018	08	02	06	6,8
2º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
27/10/2018	17/11/2018	27/12/2019	03	02	01	5,8
3º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
27/12/2018	17/01/2019	28/02/2019	06	02	04	6.1

**Estimado retirando 03 semanas da idade dos pais no primeiro nascimento

Fonte: SALGADO, 2020

Também neste grupo foi formado um casal entre um macho não irradiado e uma fêmea irradiada com 1 Gy. Os resultados apresentados na Tabela 26 abaixo mostram um total de 31 filhotes, analisando as três primeiras gerações (primeiro parto de cada geração), com uma média de 7,7 filhotes por parto e 5,6 semanas de intervalo para o 1º parto.

Tabela 26 – Casal: ♂ não irradiado X ♀ irradiada com 1 Gy, acompanhado até a terceira geração

Casal ♂ não irradiado x ♀ irradiada com 1 Gy						
Nascimento ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
23/06/2018	14/07/2018	22/08/2018	08	03	05	5,7
1º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
22/08/2018	13/09/2018	21/10/2018	06	03	03	5,3
2º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
21/10/2018	11/11/2018	17/12/2018	09	06	03	5,3
3º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
17/12/2018	07/01/2019	17/02/2019	08	03	05	6,0

**Estimado retirando 03 semanas da idade dos pais no primeiro nascimento

Fonte: SALGADO, 2020

Um acasalamento em sentido contrário, ou seja, considerando um macho originado de um embrião irradiado com 1 Gy foi acasalado com uma fêmea não irradiada.

Este casal produziu um total de 28 filhotes em 03 gerações, considerando-se o primeiro parto de cada geração e durante 03 gerações. Ainda como parâmetro reprodutivo, foi observado uma média de 07 filhotes por parto e um intervalo de 5,8 semanas para o 1º parto (Tabela 27).

Tabela 27 – Casal: ♂ irradiado com 1 Gy X ♀ não irradiada, acompanhado até a terceira geração

Casal ♂ irradiado com 1 Gy X ♀ não irradiada						
Nascimento ♂	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
23/06/2018	14/07/2018	21/08/2018	07	04	03	5,6
1º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
21/08/2018	12/09/2018	26/10/2018	06	02	04	6,4
2º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
26/10/2018	16/11/2018	22/12/2018	06	04	02	5,3
3º Geração						
Nascimento ♂ ♀	Acasalamento	1º Parto	N	♂	♀	Primeiro parto em semanas**
22/12/2018	12/01/2019	21/02/2019	9	06	03	5,8

**Estimado retirando 03 semanas da idade dos pais no primeiro nascimento

Fonte: SALGADO, 2020

5.8.2.3 Resultados do retroacasamento das fêmeas com anoftalmia nascidas da irradiação com 1 Gy e 1,5 Gy e seu filho macho de primeira geração

Os experimentos realizados com acasalamentos programados entre fêmeas que nasceram com a alteração fenotípica (anoftalmia) e seus filhos machos (retroacasamentos) foram conduzidos para se identificar um padrão de transmissão da mutação para as progênes. Contudo, nenhuma das fêmeas (nascida da dose de 1 Gy ou de 1,5 Gy) tiveram filhos com qualquer alteração fenotípica, sugerindo tratar-se de uma mutação somática.

Os parâmetros reprodutivos coletados com estes casais em 03 partos, revelou um tamanho médio da ninhada igual a 6,7 nascimentos por parto com 1 Gy e 6,3 com 1,5 Gy.

5.8.2.4 Resultados observados até a 3^o geração dos dados reprodutivos e das alterações fenotípicas observados nas progênie dos acasalamentos de: embriões cultivados com AzP brasileiro e alemão; embriões irradiados na presença do AzP brasileiro e alemão; embriões irradiados sem AzP

Os resultados observados em todos os grupos após o acompanhamento por 03 gerações demonstram que a mutação observada nos animais tem natureza somática, uma vez que acasalados, por três gerações produziram uma progênie normal conforme pode se verificar na tabela 28.

Tabela 28 - Dados reprodutivos e alterações fenotípicas dos grupos acima, acompanhados até a terceira geração

Grupos	Tamanho médio da ninhada/parto	Primeiro parto em semanas**	Alterações Fenotípicas
Controle	09	5,4	Não
AzP Brasileiro	6,2	6,1	Não
AzP Alemão	6,2	6,1	Não
AzP Brasileiro Irradiado	07	5,7	Não
AzP Alemão Irradiado	6,8	5,9	Não
♂ x ♀ Irradiado 1,5 Gy	6,5	5,9	Não
♀ Irradiada 1,5 Gy x ♂ Não	6,5	5,6	Não
♂ x ♀ Irradiado 1 Gy	5,7	6,0	Não
♀ Irradiada 1 Gy x ♂ Não	7,7	5,6	Não
♂ Irradiado 1 Gy x ♀ Não	07	5,8	Não

**Estimado retirando 03 semanas da idade dos pais no primeiro nascimento

Fonte: SALGADO, 2020

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os experimentos realizados na primeira parte deste trabalho tiveram como objetivo, avaliar se a deposição do composto (azul da Prússia) no meio de cultivo, não comprometeria o desenvolvimento dos embriões, pois somente condições muito bem definidas e estáveis permitirão aos embriões se dividirem e alcançarem o estágio de blastocisto. Assim, pequenas mudanças comprometem definitivamente o embrião, que não se desenvolve, se fragmenta ou degenera (WHITTEN, 1956; 1968).

Para investigar esta possibilidade, embriões de camundongos foram cultivados desde o estágio de 02 células até blastocisto.

Contudo, em razão da complexidade dos ensaios realizados e da fragilidade dos embriões foi necessário um conhecimento prévio nas tecnologias utilizadas, o que somente foi possível devido o *Know-how* e a experiência acumulada ao longo de 30 anos de atividade do Laboratório de Criopreservação e Reprodução Assistida - LabCrio do CEMIB/UNICAMP.

O cultivo na presença de ambos os compostos, a Radiogardase que é comercial e a formulação desenvolvida pelo Laboratório de Farmácia da Marinha do Brasil, demonstrou que até a concentração de 1.5 mg/mL, não havia diferença na capacidade dos embriões se desenvolverem, porém com 3.0 e 6.0 mg/mL, tanto a formulação alemã quanto a nacional interferiram, sendo contudo, que o AzP alemão interferiu significativamente menos.

No caso do composto brasileiro, com 3.0 mg/mL somente 4,16% dos indivíduos se desenvolveram até blastocisto, contra 95,8% do composto alemão. Já na concentração de 6.0 mg/mL, 58,3% dos embriões chegaram a blastocisto no composto alemão, enquanto nenhum se desenvolveu com a formulação brasileira. Uma possível explicação seria a presença de componentes tóxicos em baixa concentração no composto nacional, que aumentaria proporcionalmente à medida que mais produto era adicionado ao meio. Contribui com esta hipótese a constatação de que moléculas que podem desestabilizar o meio de cultivo de embriões são importantes fatores de interferência e podem comprometer o desenvolvimento dos embriões *in vitro* (MARTINEZ, *et al.*, 2017).

Outra possibilidade é o processo de fabricação, que poderia deixar algum resíduo que atue como um contaminante. Para testar esta hipótese, amostras de

ambas as formulações foram reservadas para posterior análise com espectrometria de massas. De qualquer forma, os resultados observados demonstram uma menor interferência do produto comercial alemão quando comparado com o brasileiro, que poderá estar relacionado com a sua qualidade (Chemsafety PRO, 2019; PAMIES *et al.*, 2011).

Corroboram estes achados o padrão dose resposta observado, onde a diferença no comportamento das curvas indica que o AzP brasileiro reduz em 3 vezes o número de blastocistos, ao mesmo tempo em que apresenta uma dose letal 50 (LD50) também significativamente menor com 2,31 mg contra 6,48 mg do comercial. A LD50 permite a avaliação da toxicidade e é importante nos casos de intoxicação aguda, isolada ou em associação entre drogas, sendo comum ser referenciado com o emprego de animais de laboratório (Manual de Toxicologia Clínica, 2017; KASVI, 2018).

Uma vez identificadas as condições para o uso do composto em cultivo, foi escolhida a dose de 1,5 mg/mL, pois nesta concentração os blastocistos apresentaram uma zona pelúcida íntegra e uma morfologia similar ao grupo controle, com a massa celular interna e a blastocèle preservadas. Alterações morfológicas nos embriões são importantes indicativos tanto de viabilidade, quanto de problemas na qualidade de meios de cultivo (COSSIELLO, 2009).

Desta forma, com esta concentração poderiam ser realizados os experimentos relacionados com o AzP e sua influência na irradiação dos embriões.

Neste sentido, é bastante conhecida a propriedade de a radiação ionizante alterar as características originais dos materiais na qual ela incide, podendo, por exemplo, formar agregados e moléculas altamente reativas. A radiação ionizante é um processo físico onde a energia emitida é muito superior à energia de ligação entre elétrons e seu núcleo, conduzindo à remoção dos elétrons de sua órbita (NOUAILHETAS, 2008).

O efeito modificador da radiação acontece tanto em soluções, quanto em material seco, sendo que em soluções aquosas os danos são maiores em razão dos produtos da radiólise da água. A radiólise da água é uma consequência das mudanças no meio devido à absorção de radiação de alta energia. Em decorrência da radiólise da água, são formados radicais livres altamente reativos.

Os radicais livres são entidades químicas que, em razão de terem átomos

com a sua última camada sem o número de elétrons necessários para dar estabilidade à estrutura, ficam altamente reativos. Desta forma, além de interagir com as moléculas em solução, os radicais livres podem sofrer recombinação originando, por exemplo, H_2O_2 , que é altamente tóxico para os embriões (NOUAILHETAS, 2008). Dayal *et cols.* por exemplo, demonstraram haver uma relação entre os efeitos do H_2O_2 na presença e na ausência de *scavenger* (catalase) e mutações em células de mamíferos que podem persistir por várias gerações (DAYAL, 2008).

Além das recombinações, também é importante destacar os efeitos da radiação ionizante e dos radicais livres sobre o DNA. Como principal molécula envolvida nos processos biológicos e reprodutivos, o DNA modificado poderá ter um efeito somático de dano local, mas também poderá transmitir uma mutação a gerações futuras. Desta forma, em razão dos fortes impactos que as mutações têm, qualquer evento que possa modificar o DNA deve ser considerado (ACHRE, 1995; BIER, 1997; PLOKHY, 2018). Um evento importante originado com a radiação é a alteração na molécula de DNA devido a espécies endógenas reativas de oxigênio geradas durante o metabolismo celular normal em um ambiente aeróbico. Este evento associado à instabilidade genômica induzida pela radiação promoveram alterações significativas em células e tecidos de mamíferos em cultivo (KESZENMAN, 2015).

No DNA a radiação pode atuar de uma maneira direta ou indireta. A ação direta se caracteriza pelo choque entre a radiação e a molécula, e a indireta pela ação dos radicais livres formados (H e OH), que são altamente reativos, podendo ionizá-lo. Estes são os eventos responsáveis pelas mutações com consequências locais e ou por aquelas percebidas em gerações futuras.

Outro ponto importante são as possíveis alterações nas características físico-químicas de outras moléculas essenciais ao processo de desenvolvimento embrionário, e que podem também sofrer a interferência da radiação. Um exemplo desta afirmativa é a formação de agregados de proteínas observados com a radiação (KUMITA, 1961; NASCIMENTO, 1996).

Embora já se conheça relativamente bem os efeitos da radiação sobre os seres vivos, para o propósito deste trabalho (investigar o AzP de uso comercial e uma nova formulação nacional em diferentes condições), também era importante avaliar se a radiação poderia comprometer a funcionalidade do meio de cultivo,

uma vez que ele tem em sua composição diversos sais e proteínas que poderiam ser alterados comprometendo o seu uso. Desta forma, para avaliar os danos da radiação sobre ele, alíquotas de meio M16 foram irradiadas em diferentes doses e posteriormente receberam embriões não irradiados.

A irradiação do meio nas doses de 1; 1,5 e 4 Gy seguida da deposição de embriões recém coletados, conduziu a um desenvolvimento embrionário de 0,81; 0,90 e 0,50 respectivamente. No grupo controle, para estas doses, foi observado um desenvolvimento de 0,97; 100 e 0,94. Esses dados demonstram que um aumento na dose da irradiação sobre o meio M16, está diretamente relacionado a uma diminuição no desenvolvimento embrionário. Corrobora esta afirmação o fato deste experimento ser do tipo dose resposta e como pode ser observado na Figura 19, o aumento nas doses implicou diretamente na sua qualidade, e interferiu na sua condição de promover o desenvolvimento embrionário.

Paralelamente os resultados também demonstraram que em doses mais baixas (1 e 1,5 Gy) o meio irradiado não sofreu modificações significativas, com um desenvolvimento embrionário observado até o estágio de blastocisto, muito próximo ao esperado. Contudo, com a maior dose (4 Gy) constatou-se uma diferença significativa no número de indivíduos que chegaram a blastocisto indicando que o meio teve a sua funcionalidade comprometida. O uso de embriões em testes de meios de cultivo é bastante comum e serve de indicativo de sua qualidade (GILBERT, 2016). Também são utilizados embriões em ensaios de toxicidade de substâncias ou moléculas presentes em diversos produtos. No presente estudo foi utilizado este sistema para avaliar uma possível toxicidade decorrente da radiação e sua relação com a dose (DE JONG, 2011).

Assim, as doses de 1,0 Gy e 1,5 Gy puderam ser utilizadas pois não apresentaram diferenças significativas com os controles e desta forma não inviabilizariam o uso do meio nos ensaios de cultivo envolvendo a radiação.

Contudo, após esta constatação uma outra hipótese precisou ser testada: avaliar se o AzP também irradiado não sofreria mudanças que impossibilitassem o seu uso em experimentos com a radiação.

Para esta avaliação, uma quantidade igual a 1,5 mg de AzP brasileiro e comercial foi irradiado juntamente com o meio de cultivo, que em seguida recebeu embriões não irradiados que foram observados diariamente. Os resultados demonstraram que ambos os compostos não impediram o desenvolvimento dos

embriões. No caso da dose de 1 Gy, os resultados observados sugeriram que a presença do AzP reduzia os efeitos negativos da radiação que foi observado no meio de cultivo quando este foi irradiado isoladamente naquela dose, quando sem o composto 81% dos indivíduos se desenvolveram enquanto com o AzP brasileiro 90% apresentou crescimento e como alemão 90% dos embriões chegaram a blastocisto.

Substâncias radioprotetoras podem atuar diminuindo os efeitos da radiação de diferentes maneiras. Nos anos 1950, experimentos demonstraram que quando a cisteína era administrada em doses elevadas a ratos expostos a doses letais de raios x, ela conferia proteção aos animais (BUMP, 1998; NAIR, 2001).

No caso do azul da Prússia, uma possível explicação para estes resultados, seria o fato dele normalmente agir como resina de troca iônica.

A resina de troca iônica é uma matriz insolúvel que remove cátions e ânions do meio, podendo liberar íons sódio ou hidrogênio (resina catiônica) ou hidroxila (resinas aniônicas). Uma vez que a radiação pode provocar o surgimento de agregados e moléculas altamente reativas que poderiam ficar diferentemente carregadas após a captação de alta energia, uma possível hipótese para o entendimento na manutenção da estabilidade do meio de cultivo irradiado na presença do azul da Prússia é a ação deste composto como a fase estacionária, que estaria realizando a adsorção de subprodutos formados pela radiação, removendo, desta forma, parte destas novas moléculas.

Observando-se a fórmula estrutural do azul da Prússia, pode-se supor que os grupamentos químicos mais externos que compõem a molécula, estejam atuando como aceptores (*scavengers*) de radicais livres que foram formados na irradiação. Desta forma o AzP estaria atuando como um quelante na retirada destes subprodutos, como por exemplo os radicais livres (ABRÃO, 1972).

Substâncias quelantes são altamente reativas e se ligam a outras moléculas possibilitando a sua remoção. A cisteína; a glutatona, a arginina; a glicina o DMSA (Ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico) e o DMPS (2,3 dimercapto1 propano ácido sulfônico) são exemplos de agentes quelantes com alta capacidade de remoção de radicais livres e de metais como mercúrio, chumbo, prata, níquel, entre outros (BJØRKLUND, 2019). Um exemplo de uma molécula quelante de grande importância na remoção de radiais livres é a cisteína (TANDON, 2002).

Após os experimentos com a irradiação do meio de cultivo e dos compostos nacional e comercial, foram realizados experimentos com a irradiação direta dos embriões. Estes ensaios objetivaram investigar se o AzP nacional e ou comercial, exerceriam alguma influência sobre os indivíduos quando estes estivessem expostos à radiação, como por exemplo, mitigando efeitos prejudiciais da radiação sobre eles. Para tanto, os primeiros experimentos foram realizados irradiando os embriões isoladamente com diferentes doses.

As moléculas biológicas são formadas principalmente por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, e com a irradiação elétrons poderão ser deslocados destes átomos, ocorrendo uma ionização toda vez que a energia da radiação for superior ao valor da energia de ligação do elétron aos átomos destes elementos. Desta forma, o papel biológico da molécula atingida poderá ser modificado (NOUAILHETAS, 2008).

Enquanto com 1 Gy e 1,5 Gy não foram observadas diferenças na comparação com o grupo controle não irradiado, na dose de 4 Gy observou-se uma letalidade para 75% dos indivíduos irradiados e com 500 Gy a taxa foi de 100%. Os efeitos da radiação sobre os organismos são bastante conhecidos. Contudo, para cumprir com um dos objetivos deste trabalho era fundamental a identificação de uma dose que possibilitasse a avaliação do AzP quando irradiado juntamente com os embriões (CMIELOVÁ, 2011).

Assim como com diversos agentes químicos, a radiação também tem efeito sobre os indivíduos em desenvolvimento, podendo, inclusive, ser teratogênico. No caso da radiação, os efeitos tardios são considerados como uma consequência de uma lesão irreparável no material genético das células. Neste caso, ou os indivíduos sobreviveram aos efeitos agudos, ou foram expostos a doses menores que as necessárias para produzir uma lesão aguda (REVISTA NAVIGATOR, 2008; LANARO, 2011).

Assim como foi observado com a irradiação do meio de cultivo, doses maiores implicaram diretamente na viabilidade dos embriões, e da mesma forma, ou seja, com um comportamento do tipo dose resposta. Assim, o aumento na dose aumentou consideravelmente a mortalidade dos indivíduos (LITTLE, 2003).

Segundo o CDC, no caso de gestantes humanas, a depender do estágio de desenvolvimento, as consequências para a saúde do feto podem ser severas em exposições maiores que 0,5 Gy, mesmo que a dose seja baixa para causar um

efeito imediato para a mãe. Estas consequências incluem restrição de crescimento, malformações, prejuízos para a função cerebral e câncer (CDC, 2019).

Entretanto, para este estudo foi importante a identificação de uma dose que permitisse avaliar os efeitos do AzP em uso conjunto com embriões no momento da irradiação. Os primeiros resultados com embriões irradiados, indicaram uma sobrevivência de 68% dos indivíduos irradiados nas doses de 1Gy e 1,5 Gy. Posteriormente, com o aumento no número de embriões foi observado uma sobrevivência de 71% dos indivíduos com 1 Gy e de 65% com 1,5 Gy o que não representou uma diferença significativa. Assim, considerou-se que 1 Gy e 1,5 Gy eram as doses mais adequadas para os testes com o azul da Prússia.

Desta forma, os resultados demonstraram que a radiação exerce influência sobre os embriões; doses maiores aumentam a mortalidade dos indivíduos e que a dose de 1,5 Gy era indicada na investigação dos efeitos do azul da Prússia sobre embriões irradiados.

Para os experimentos com a irradiação dos embriões na presença do AzP, foi considerado o fato de resultados anteriores terem demonstrado que quantidades superiores a 3 mg do composto mesmo sem a irradiação, prejudica o desenvolvimento dos indivíduos e por esta razão, 3 mg foi a quantidade máxima utilizada na irradiação com 1; 4 e 500 Gy.

Contudo, os resultados obtidos demonstraram uma diferença entre os dois compostos com relação aos controles frente à quantidade depositada e a dose de radiação aplicada.

Com a menor quantidade de AzP (0,5 mg), a formulação brasileira apresentou um percentual de sobrevivência menor na irradiação com 1 Gy que a alemã, não sendo contudo, uma diferença elevada (72% de sobrevivência no nacional contra 80% na Radiogardase). Paralelamente, um aumento na quantidade de AzP para 1,5 mg, conduziu a uma mesma taxa de sobrevivência na dose de 1 Gy, onde 80% de indivíduos chegaram a blastocisto em ambos os compostos.

Da mesma forma, o uso de uma concentração de 1,5 mg de AzP e um aumento de 50% na dose da irradiação (1,5 Gy), não revelou diferença nas formulações, pois ambas apresentaram uma sobrevivência correspondente a 88% dos indivíduos e não significativo quando comparado com os grupos controle.

Embora anteriormente o cultivo com o AzP alemão com 3 mg não tenha interferido no desenvolvimento dos embriões, com a irradiação este resultado não se confirmou, sugerindo a presença de algum elemento que sofreu os efeitos da radiação e que somente pôde ser observado com uma quantidade maior do composto. Como já discutido anteriormente, os embriões são muito sensíveis à presença de contaminantes no meio no qual eles estão sendo cultivados. Por esta razão, a presença, ainda que em pequena quantidade de subprodutos de um processo de fabricação e que normalmente não traria consequências, mas que com a radiação estes elementos poderiam ter as suas características originais modificadas, explicando, ainda que parcialmente, os resultados observados.

Uma vez identificadas a quantidade de AzP e a dose de radiação capazes de demonstrar se o composto nacional e a radiogardase poderiam conferir alguma proteção a embriões irradiados, foram realizados experimentos com 1,5 Gy e 1,5 mg de AzP com um número maior de indivíduos irradiados que foram comparados com um grupo controle não irradiado.

Enquanto os embriões irradiados isoladamente apresentaram uma sobrevivência de 65%, no grupo irradiado na presença da radiogardase 97% dos embriões chegaram a blastocisto e no grupo com o AzP nacional 94% deles se desenvolveram. No grupo controle este percentual foi de 99% de desenvolvimento, indicando que as condições nas quais o experimento foi conduzido estavam adequadas ao desenvolvimento dos indivíduos. Desta forma, enquanto não se observou diferença entre os grupos irradiados com ambos os compostos e o controle, com o grupo irradiado sem o AzP a mortalidade foi significativamente maior, o que demonstrou que nas condições utilizadas tanto o azul da Prússia formulado pela marinha brasileira quanto a radiogardase protegeram os embriões dos efeitos da radiação.

Estes resultados corroboram achados anteriores que demonstraram que o AzP é um composto radioprotetor e atua como um *scavenger* removendo toxinas originadas com a radiação e que prejudicam o desenvolvimento dos indivíduos no desenvolvimento até blastocisto (SMITH, 2017).

Após a descoberta desta propriedade do azul da Prússia fabricado pelo laboratório de farmácia da marinha do Brasil e da radiogardase, postulamos se o grupo de embriões cultivados na presença de ambos os compostos; bem como os indivíduos irradiados juntamente com eles e os irradiados isoladamente, poderiam

ter sofrido alterações genéticas e ou fenotípicas ou mesmo se permaneceriam viáveis.

Para investigar estas hipóteses, foram realizados experimentos *in vivo* com o implante de embriões em fêmeas receptoras pseudoprenhes. O implante de embriões é uma tecnologia bastante sofisticada e requer habilidades técnicas e embriões viáveis para ser bem sucedida (SALGADO & PASSOS, 2009; 2017).

Inserida como uma técnica em reprodução assistida, a transferência embrionária é frequentemente utilizada na produção de animais geneticamente modificados o que a consolidou, tornando-a muito bem estabelecida (FOX, 2007). Por meio da transferência embrionária é possível a avaliação de aspectos relacionados com a reprodução (gestação e parto) e também a identificação de alterações fenotípicas e genotípicas (MAMROT *et al.*, 2015).

Por esta razão, para cumprir com estes objetivos, tanto a qualidade e as características das progênies foram avaliadas, como também o fenótipo das crias; além de parâmetros reprodutivos como o tamanho médio da ninhada, número de partos e o intervalo entre partos, uma vez que estas características estão bem definidas como performance de linhagens (informatics.jax.org, 2019; 2020).

A escolha do estágio de blastocisto se deu pelo fato de ser o estágio máximo de desenvolvimento *in vitro*, o que possibilitaria a observação de resultados mais próximos à realidade, pois os indivíduos teriam ficado expostos às condições experimentais por um longo período, ou seja, por pelo menos 04 dias.

Assim, o primeiro grupo de embriões implantado pela via intrauterina foi composto de blastocistos obtidos com o cultivo com os compostos brasileiro e alemão.

Os experimentos *in vivo* com a transferência embrionária visando comparar as duas formulações puderam ser realizados.

Os resultados dos implantes com embriões que se desenvolveram na presença de 1,5 mg/mL de ambos os compostos, quando comparados com o grupo controle que não teve contato com o AzP, demonstraram que nesta concentração eles permaneciam viáveis. Das fêmeas que receberam os embriões do grupo brasileiro, 30,8% engravidaram enquanto no grupo controle este percentual foi de 70%. No grupo de fêmeas que receberam embriões cultivados com o composto comercial, 33,3% engravidaram contra 55,5% do grupo controle.

Estes resultados demonstram que, embora se observe uma redução no percentual de fêmeas que emprenharam na comparação com o grupo controle, esta redução não foi significativa. Dados da literatura especializada internacional indicam percentuais entre 36,1 % a 45,3% como esperados quando as condições do implante estão adequadas (PALACIO & SZTEIN, 2018).

Paralelamente a comparação entre os compostos não indicou diferença no número de partos, demonstrando nem o composto brasileiro e nem o composto alemão comprometeu a reprodução.

Com relação ao número de filhotes nascidos dos implantes de ambos os grupos (AzP nacional e comercial), os resultados demonstram que no grupo de implantes com embriões cultivados com produto brasileiro o número de nascimentos foi um pouco maior. A prenhes é um evento complexo, acontece em etapas e os seus momentos iniciais são determinantes na condução do processo. Além disso, o implante de embriões é uma técnica sensível e pode variar mesmo entre grupos e realizados nas mesmas condições (SALGADO & PASSOS, 2009).

Por outro lado, o tamanho da ninhada obtido após a transferência dos embriões reforça que a gestação não sofreu interferência do composto (informatics.jax.org, 2019; 2020).

Uma vez identificado que o cultivo na presença de ambos os compostos não inviabilizava a gestação e o parto, realizamos um implante de embriões de 02 células que foram irradiados com 1,5 Gy juntamente com 1,5 mg do AzP alemão e brasileiro, utilizando como controle embriões não irradiados. Os resultados obtidos não indicaram diferença significativa no número de partos dos implantes do AzP, contudo, com relação ao tamanho médio da ninhada o número de nascimentos por fêmea apresentou uma diferença significativa na comparação com os grupos controle de ambos os compostos. A redução no número de animais nascidos por parto nas fêmeas que receberam os embriões irradiados com os compostos, corroboram resultados anteriores do cultivo com o AzP irradiado, onde consideramos a hipótese de um contaminante em quantidade reduzida que poderia estar impactando diretamente os embriões. Este achado poderia explicar os resultados obtidos neste experimento. Corrobora esta hipótese o fato da redução ter sido observada em ambas as formulações. Neste sentido, o composto brasileiro apresentou uma proporção maior no número de filhotes nascidos.

Ainda com relação aos implantes com embriões irradiados na presença do AzP, no grupo de embriões que se desenvolveram até blastocisto e que foram irradiados na presença de ambos os compostos, também se observou um maior proporção de partos e filhotes no composto nacional em relação ao comercial. Uma possível explicação para este resultado poderia ser o tamanho dos cristais observados nos compostos, podendo estar presente uma agressão à membrana dos embriões.

Após a avaliação dos resultados dos implantes com embriões irradiados com o AzP, foram realizadas transferências com embriões irradiados isoladamente. Nas duas doses utilizadas (1 Gy e 1,5 Gy) foi detectado o nascimento de um animal sem globo ocular, sugerindo que a radiação interferiu na gênese daquele órgão modificando o fenótipo.

A possibilidade da radiação provocar alterações no DNA que comprometem o fenótipo é bem conhecida (CMIELOVÁ, 2011; NAKAMURA, 2018). Contudo, chama a atenção o fato destas alterações serem mais comuns em doses mais elevadas de radiação. Este fato poderia explicar o reduzido número de indivíduos que apresentaram esta anomalia (LUNTZ, 2017; DALKE, 2018).

Uma vez detectada a presença de anomalia na progênie de embriões irradiados, foram realizados acasalamentos programados para melhor avaliar a alteração no DNA.

Foram realizados 03 esquemas de acasalamentos: entre indivíduos afetados; entre um indivíduo afetado e um animal normal e entre filhos de primeira geração com um dos parentais afetado na forma de um retro acasalamento.

Em nenhum dos nascimentos destes acasalamentos ou das progênies acompanhadas até a terceira geração foram gerados animais com anomalias, demonstrando se tratar de uma mutação de origem somática onde o dano na molécula de DNA aconteceu no embrião que foi implantado em decorrência da exposição à radiação. Acasalamentos teste são utilizados para avaliar mutações no genoma que são transmitidas para gerações futuras. É uma estratégia que foi muito utilizada no passado como ferramenta para a monitorização genéticas de linhagens isogênicas de camundongos. A adaptação desta estratégia neste trabalho e o seguimento das progênies até a terceira geração corroboram a hipótese de ser um dano local na molécula do DNA (ESAKI, 1984).

A despeito da possibilidade de se poder avaliar de maneira direta o fenótipo, e indiretamente, por meio de acasalamentos programados, o genótipo dos animais, uma outra abordagem foi realizada visando detectar modificações nos parâmetros reprodutivos de intervalo entre partos; o tamanho médio da ninhada e o tempo em semanas do acasalamento até o primeiro parto por três gerações. A reprodução é um evento complexo que acontece em fases e no presente trabalho a exposição de embriões ao AzP diretamente no cultivo, ou na irradiação conjunta com ele, poderia provocar danos passíveis de serem transmitidos a gerações subsequentes (BASHA, 2017).

Os dados coletados com o acompanhamento por 3 gerações do grupo controle indicou uma média de 9 filhotes por parto e 5,4 semanas de intervalo para o primeiro parto.

No grupo de embriões que foi implantado após o cultivo na presença dos dois compostos, na média das 3 gerações foram obtidos 6,2 filhotes por parto e 6,1 semanas de intervalo para o primeiro parto tanto com o Azp brasileiro quanto com a radiogardase de origem alemã.

Também no grupo de embriões que foram implantados após a irradiação na presença de ambos os compostos, os dados coletados demonstraram 07 filhotes por parto e um intervalo de 5,7 semanas para o primeiro parto com a formulação nacional e 6,8 nascimentos por parto e um intervalo de 5,9 semanas até o primeiro parto.

No caso dos parâmetros dos grupos de embriões irradiados isoladamente, os resultados foram de uma média de 6,5 filhotes por parto e 5,9 semanas de intervalo até o primeiro parto.

Como resultado dos grupos acasalados programadamente a partir dos animais que apresentaram a ausência do globo ocular, as médias observadas para estes parâmetros em 3 gerações, foram igual a 6,5 filhotes por parto e 5,6 semanas de intervalo até o primeiro parto.

Uma comparação destes grupos com o grupo controle formado por embriões sem tratamento e que também foi acompanhado por 3 gerações, demonstra uma pequena redução nos dois parâmetros analisados; tamanho médio da ninhada e intervalo em semanas do acasalamento até o primeiro parto. Contudo, a redução observada não foi significativa, mesmo quando os parâmetros foram acompanhados por um período tão grande em termos de gerações.

LAWSON e colaboradores (2011) demonstraram que a exposição a baixas doses durante o desenvolvimento fetal de camundongos, ao Bisfenol A, causa efeitos adversos sobre a reprodução com consequências multigeracionais, ou seja, a exposição de uma geração aumenta a probabilidade de defeitos nas gerações subsequentes.

Um outro exemplo é o dietilestilbestrol (DES), um estrogênio sintético que era administrado a mulheres grávidas para evitar o aborto, parto prematuro e complicações relacionadas à gravidez. NEWBOLD, *et al.*, publicaram em 2005 um estudo demonstrando que esta forma sintética do hormônio feminino se administrada durante períodos críticos de diferenciação do trato reprodutivo, resultava em anormalidades a longo prazo como por exemplo a neoplasia de útero que se manifestaria somente muito mais tarde na vida.

Além disso, os dados coletados pelos autores demonstraram que o aumento na susceptibilidade a tumores era transmitido da linhagem materna para as gerações subsequentes de descendentes masculinos e femininos.

Skinner (2014) demonstra que exposições ambientais a tóxicos, e outros elementos como estresse e mesmo a nutrição, podem promover uma transmissão não genética de herança como, por exemplo, aumento na susceptibilidade a doenças.

Também camundongos machos e fêmeas quando irradiados no 12º dias de seu desenvolvimento, apresentaram um aumento nas frequências de mutação na linha germinativa e em tecidos somáticos que permaneceu durante a idade adulta. Os autores sugerem uma correlação no aumento de leucemias e câncer sólido nos animais após o nascimento (BARBER, *et al.*, 2009).

Estes dados reforçam a importância de se investigar a ocorrência ou não de eventos multigeracionais que poderiam decorrer da exposição dos embriões aos compostos brasileiro e alemão, tanto no cultivo quanto na irradiação dos embriões juntamente com eles.

Os resultados dos acasalamentos até a terceira geração, realizados com as progênes dos diversos grupos tiveram como objetivo demonstrar possíveis danos ao DNA dos indivíduos que poderiam ter sido causados pelos compostos nacional e comercial. O DNA é uma molécula que pode sofrer os efeitos de produtos químicos e da radiação entre outros (MARTINEZ, *et al.*, 2017).

Uma vez alterado o DNA, a mutação poderá se manifestar no fenótipo de maneira perceptível ou não (MATTHEWS, 2016; RONDÓN, 2016).

No presente estudo, os resultados não demonstraram quaisquer alterações nos fenótipos em nenhuma das três gerações, e também os padrões esperados para a reprodução da linhagem utilizada estavam de acordo com a literatura com relação ao tamanho média da ninhada e o primeiro parto em semanas (informatics.jax.org, 2019; 2020).

Os resultados demonstram que nas condições utilizadas, tanto o azul da Prússia comercial (RadiogardaseTM) quanto o produzido pelo Laboratório de Farmácia da Marinha do Brasil, não causaram mutações visíveis ou permanentes, conforme observado pelo padrão fenotípico normal das progênes dos acasalamentos programados, bem como indicaram que não houve uma interferência dos compostos para os parâmetros reprodutivos investigados com os compostos na presença e na ausência de irradiação.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na avaliação do azul da Prússia comercial de origem Alemã (Radiogardase™) e com o desenvolvido pelo Laboratório de Farmácia da Marinha do Brasil permitem as seguintes conclusões:

- 1- Nenhum dos compostos inibiu o desenvolvimento *in vitro* dos embriões até o estágio de blastocisto;
- 2- A irradiação do meio de cultivo em dose superior a 4 Gy comprometeu o desenvolvimento embrionário;
- 3- O azul da Prússia irradiado em doses menores (1 Gy e 1,5 Gy) não compromete o desenvolvimento dos embriões;
- 4- A irradiação dos embriões em dose superior a 4 Gy ocasionou a morte dos indivíduos;
- 5- O azul da Prússia removeu subprodutos da radiação no meio irradiado com 1 Gy e 1,5 Gy;
- 6- Nas doses de 1 Gy e 1,5 Gy o azul da Prússia protegeu os embriões dos efeitos prejudiciais da radiação;
- 7- O azul da Prússia não inviabilizou a gestação e o parto;
- 8- O implante de embriões cultivados na presença do azul da Prússia brasileiro e alemão revelou não existirem alterações fenotípicas nos indivíduos;
- 9- Os parâmetros reprodutivos de tamanho médio da ninhada, número de partos e intervalo entre partos não foram alterados no acompanhamento das progênes até a 3º geração;
- 10- Os acasalamentos programados realizados por 3 gerações com embriões expostos diretamente ao azul da Prússia brasileiro e alemão no cultivo e na irradiação conjunta com ambos os compostos, não revelaram o surgimento de mutações de ordem germinativa, não sendo observadas alterações em nenhuma das progênes;
- 11- Os resultados obtidos demonstraram que o azul da Prússia, nas condições experimentais empregadas, não induziu alterações fenotípicas e teratogênicas nos animais. Contudo, outros estudos devem ser conduzidos para avaliar a possibilidade de sua administração em gestantes expostas a

radiação, uma condição ainda não descrita na prescrição deste medicamento.

- 12- O composto desenhado originalmente para tratar uma contaminação interna, demonstrou, de forma inesperada, uma ação também contra radiação de fonte externa, oferecendo proteção contra raios gama de ^{60}Co .

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, A. **Operações de Troca Iônica**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – CNEN/SP, 1972.

ACHRE. Advisory Committee on Human Raadiation Experiments – Final Report. Introduction: How Does Radiation Affect Humans? 1995. Disponível em: <https://bioethicsarchive.georgetown.edu/achre/final/intro_9_5.html>. Acesso em: 25 abr. 2020.

ANDREAS, K., GOSSLER., In: HEDRICH, H. J. **The laboratory mouse**: Cap. 2.1. Early Mouse Development. p. 117-143. 2012.

ANDRADE, E. Ação dos agentes radioprotetores, 2012. Disponível em: <<https://prezi.com/riqpmwjinhq/radioprotetores/>> Acesso em: 29 abr. 2020.

ARNALDO, P. & MEDEIROS, J. A. Produção do Azul da Prússia na Marinha. **Arquivos Brasileiros de Medicina Naval**, Rio de Janeiro, v.50, n.1, p. 57-58, 1988.

AOKI, W. V., *et al.*, Comparison of four media types during 3-day human IVF embryo culture. **Reproductive biomedicine** online. Vol.10, N.5, p. 600–606, 2005.

AZEVEDO, D. R., *Psicooncologia e interdisciplinaridade: uma experiência na educação a distância*, 2004.

BARBER, R.C., HARDWICK, R.J., SHANKS, M.E., GLEN, C.D., MUGHAL, S.K., VOUTOUNOU, M., DUBROVA, Y.E. The effects of in utero irradiation on mutation induction and transgenerational instability in mice. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v.664. p. 6-12. 2009.

BARBIER, F., Treatment of thallium Poisoning, **Lancet**, 7886 (II):965, 1974.

BASHA, P. M., RADHA, M. J., Gestational Di-N-Butyl Phthalate exposure induced developmental and teratogenic anomalies in rats: a multigenerational assessment. **Environ Sci Pollut Res. Int.** v. 24, p.4537–4551, 2017.

BERNARDES, J. B., **Síntese do pigmento azul da Prússia e sua utilização para a produção de tinta do tipo guache.** 2012. 55p. Trabalho de conclusão de curso. Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA. Assis.

BEZERRA, J., Acidente de Chernobyl, História Contemporânea, 2019. Disponível em: <<https://www.todamateria.com.br/acidente-de-chernobyl/>> Acesso em: 03 mar. 2020.

BEIR V. Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation: BEIR V Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiation (BEIR V), **National Research Council.** Cap 5. Radiogenic Cancer at Specific Sites p. 242:333. Disponível em <<http://www.nap.edu/catalog/1224.html>> National Academies Press. 5th ed. 1997.

BITELLI, T., Dosimetria e higiene das radiações. São Paulo: **Grêmio Politécnico,** 548 p. 1982.

BJØRKLUND G, CRISPONI G , NURCHI V. M., CAPPAL, R., DJORDJEVIC A. B. AND AASETH. A Review on Coordination Properties of Thiol-Containing Chelating Agents Towards Mercury, Cadmium, and Lead. **Journal Molecules.** v.24. p. 2:32. 2019.

BLEIL, J.D., WASSARMAN, P.M., Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. **Dev Biol;**76:185 –202, 1980.

BOS-MIKICH, A. TIMM, M.I., ZANONA, K.Q., Dos gametas ao embrião. Porto Alegre UFRGS, 2008. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/gametaembriao/>> Acesso em: 03 mar. 2020.

BUMP, A. E., TAYLOR, C. Y., BROWN, M., Role of Glutathione in the Hypoxic Cell Cytotoxicity of Misonidazole. **Cancer Resharch**. 43, 997-1002, 1983.

BUMP, E.A. AND MALAKER K. *Radioprotectors: Chemical, Biological and Clinical Perspectives*. Ed. Boca Raton, CRC Press, Cap 1, **History of Radioprotector Development**. p.15-16. 1998.

CDC – Centers for Disease Controle and Prevention. Radiation and Pregnancy: Information for Clinicians. April, 29, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/nceh/radiation/emergencies/pdf/303779-A_2019_Radiation-and-Pregnancy_508.pdf>. Acesso em: 25 maio 2020.

CHAMPION, D., VERGER, P., VIDAL, M., RENAUD, P., HUBERT, P., TIRMARCHE, M. the health of the Chernobyl accident for France: state of the art and thyroid cancer risk assessment. **Scientific and Report**. Institut de Radioprotection et de sûreté Nucléair. p.137-142. 2002.

ChemsafetyPRO: Update: 2019-11-16. Disponível em: <https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Developmental_and_Reproductive_Toxicity.html> Acesso em: 08 fev. 2020.

CHEN, G.R., CHANG, Y. R., LIU, X., KAWAMOTO, T., TANAKA, H., KITAJIMA, A., PARAJULI, D., TAKASAKI, M., YOSHINO, K., , CHEN, MAN-LI., LO, YU-KUO., LEI, Z., LEE, DUU-JONG. Prussian blue (PB) granules for cesium (Cs) removal from drinking water. **Separation and Purificataion Technology**. v. 143, p. 146-151, 2015.

CHOI, J. K., TAO YUE, *et al.*, The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification. **Cryobiology**, Volume 71, Issue 2, 350-355, 2015.

CMIELOVÁ J, HAVELEK R, JIROUTOVÁ A, KOHLEROVÁ, R, SEIFRTOVÁ, M, MUTHNÁ, D, VÁVROVÁ, J AND REZÁČOVÁ, M. DNA damage caused by ionizing radiation in embryonic diploid fibroblasts WI-38 induces both apoptosis and senescence. **Physiological Research**. v. 60(4). p.667:677. 2011.

ConFarMarinha. Sônia Fonseca rocha. 2008. Disponível em: <<http://confarmarina.blogspot.com/2008/12/o-azul-da-prussia.html>> Acesso em: 20 jan. 2020.

COSSIELLO, RAQUEL Di FALCO, **Efeito de quatro diferentes meios de cultura na qualidade morfológica de zigotos e embriões**, Campinas, 2009. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

CURRER, M.J., *et al.*, (Ed. 6^o). **The Jackson Laboratory Handbook on Genetically Standardized Mice**. Bar Harbor, USA: 2009. Section II: Using Mice in Research. Chapter 3: Categories of Laboratory Mice - Definitions, Uses, Nomenclature. p.25-73.

CURRER, M.J., *et al.*, (Ed. 6^o). **The Jackson Laboratory Handbook on Genetically Standardized Mice**. Bar Harbor, USA: 2009. Section IV: Colony Management. Chapter 13: Breeding Strategies and Techniques. p. 241-253.

CRUZ, A. J., **As cores dos artistas – História e ciência dos pigmentos utilizados em pintura**. (Ed. 1^o). Apenas livros. 2004.

DALKE, C., NEFF, F., BAINS, S.K. *et al.* Lifetime study in mice after acute low-dose ionizing radiation: a multifactorial study with special focus on cataract risk. **Radiation and Environmental Biophysics**. v. 57 p.99 :113. 2018.

DAYAL, D., MARTIN, S.M., LIMOLI, C.L. AND SPITZ, D.R. Hydrogen peroxide mediates the radiation-induced mutator phenotype in mammalian cells. **Biochem Journal** v.1. 413(1) p. 185 :191. 2008.

De ALMEIDA, J. M. Embriologia Veterinária Comparada, 1999. Disponível em: <https://prezi.com/uidmnw_ktm0x/desenvolvimento-embrionario-do-camundongo/> Acesso em: 26 mar. 2020.

De GROOT, G., *et al.*, An Evaluation of the Efficacy of Charcoal Haemoperfusion in the treatment of Three Cases of Acute Thallium Poisoning. **Archives of Toxicology**, 57:61-66, 1985.

DE JONG, E., BARENYS, M., HERMSEN, S.A.B., VERHOEF, A., OSSENDORFP, B.C., BESSEMS, J.G.M. AND PIERSMA, A.H. Comparison of the Mouse Embryonic Stem Cell Test, the Rat Whole Embryo Culture and the Zebrafish Embryotoxicity test as Alternative Methods for Developmental Toxicity Testing of Six 1,2,4-triazoles. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 253(2) p. 103:111. 2011.

ESAKI, K. **Qualitative characters in the genetic monitoring.** IN **ICLAS Manual for genetic Monitoring of inbred Mice.** Edited by: Tatsuyi Nomura, Kozabuno Esaki, Takeshi Tomita. University of Tokyo Press, 1984.

FAUSTINO, P.J., *et al.*, Quantitative determination of cesium binding to ferric hexacyanoferrate: Prussian blue. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** Elsevier. Vol. 47 (1), p. 114-125, 2008.

FERNANDES, L.F., & SANTOS, T.A.L., Tálío, 2012. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/toxitalio/tratamento/azul-da-prussia>> Acesso em: 28 out. 2019.

FREITAS, R. M., Vigabatrina aumenta atividade da superóxido dismutase no corpo estriado de ratos após crises convulsivas induzidas pela pilocarpina. **Revista psiquiatria clínica.** vol.37 n.1 São Paulo, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2003. Federal Register /Vol. 68, No. 23 /Tuesday, February 4, 2003 /Notices. Disponível em: <<http://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2003-02-04/pdf/03-2600.pdf>> Acesso em: 15 fev. 2019.

FOX, J. W., Pseudopregnancy, The mouse biomedical research. **Academic Press**; Boston, p.103, 2007.

GILBERT, R.S., NUNEZ,. SAKURAI, K., FIELDER, T. AND NI, HSIAO-TZU. Genetic mouse embryo assay: improving performance and quality testing for assisted reproductive technology (ART) with a functional bioassay. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 14:13. 2016.

HOFFMAN, R., Thallium Toxicity and the Role of Prussian Blue in Therapy. **Toxicological Reviews**, 22 (1), 29-40, 2003.

IEA Report of United Nations Project E 11. The use of Prussian Blue to reduce radiocaesium contamination of milk and meat produced on territories affected by the Chernobyl accident. **International Atomic Energy Agency**. 1997.

Informatics.jax.org., 2019. Disponível em: <<http://www.informatics.jax.org/silver/chapters/4-1.shtml>> Acesso em: 05 jun. 2019.

informatics.jax.org, 2020. Disponível em: <<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/genetics-and-nomenclature>> Acesso em: 05 jun. 2020.

INCA - Instituto Nacional de Câncer, 2019. Radiações não ionizantes. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/radiacoes/radiacoes-ionizantes>> Acesso em: 29 fev.2020.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY - IAEA, The Radiological Accident in Goiânia, **IAEA**, Vienna, 1988.

ITOI, F., et al., Offspring from Mouse Embryos Developed Using a Simple Incubator-Free Culture System with a Deoxidizing Agent, **PLoS One**, October 2012.

JAX, 2020. Nomenclature for Mouse Strains. Available at: <<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/genetics-and-nomenclature>> Acesso em: 10 fev. 2020.

KANEKO, K., CHOUDHURI, S., Epigenetics in Reproduction and Development.; **Reproductive and Developmental Toxicology**, Chapter 52, Second Edition, p. 1005-1021, 2017.

KASVI, 2018. Toxicology: concepts, specialties and applications. Disponível em: <<https://kasvi.com.br/toxicologia-conceitos-especialidades-aplicacao/>> Acesso em: 08 jun. 2018.

KESZENMAN, D.J., KOLODIU, L AND BAULCH J.E. DNA damage in cells exhibiting radiation induced genomic instability. **Mutagenesis**. v.30 (3). P. 451:458. 2015.

KISPERT, A., GOSSLER, A., Anatomy and Normative Biology: Early Mouse Development. Chapter 2.1, **Elsevier**, 2012.

KRAFT, A., On the discovery and history of Prussian Blue. Bulletin for the history of chemistry/Division of the History of Chemistry of the American Chemical Society. Vol.33 (2). p.61-67, 2008.

KEMNIC, R.T., COLEMAN. M. Thallium Toxicity. StatPearls. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513240/>> Acesso em: 10 abr. 2020.

KUMTA, U. & TAPPEL, A. Radiation Damage to Proteins. **Nature**. v. 191. P. 1304:1305, 1961.

KYVELIDOUA, C., TSEREVELAKISB, G. J., FILIPPIDI, G., RANELLA, A., KLEOVOULOU, A., FOTAKIS, C., ATHANASSAKIS, I. Following the course of pre-implantation embryo patterning by non-linear microscopy. **Journal of Structural Biology**, 176(3), 379-386, 2011.

LANARO, D.F.P.F. Efeitos biológicos das radiações ionizantes. Instituto de Engenharia. Disponível em: <<https://www.insitutodeengenharia.org.br/site/2011/05/25/efeitos-biologicos-das-radiacoes-ionizantes/>>. Acesso em: 25 maio 2020.

LARIONOVA, J., GUARI, Y., LONG, J., In: LARIONOVA J, GUARI Y. (1ªEd.): **Prussian Blue Nanoparticles and Nanocomposites: Synthesis, Devices, and Applications**. USA: Pan Stanford Publishing; 2019. Prussian Blue Nanoparticles for Biomedical Applications. Cap. 10. p. 280 a 296. 978-0-429-02474-0 (eBook).

LAWSON, C., GIESKE, M., MURDOCH, B., Ye, P., LI, Y., HASSOLD, T., HUNT, P.A. Gene Expression in the Fetal Mouse Ovary Is Altered by Exposure to Low Doses of Bisphenol A. **Biology of Reproduction**. v.84, p.79–86, 2011.

LITTLE, J.B. Principal Cellular and Tissue Effects of Radiation. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12344/>> Acesso em: 25 maio 2020.

LONG, J., *et al.*, Prussian Blue Nanoparticles for Biomedical Applications. **Dalton Trans.** 45, 17581-17587, 2016.

LUNTZ, M., BURTON, M. Radiation. Biologic effects of ionizing radiation. Encyclopaedia Britannica, inc. 2017/14/04. Disponível em: <<https://www.britannica.com/science/radiation>>. Acesso em: 25 maio 2020.

MAMROT, J., MULYOTO, P., WALKER, D., GARDNER, D. K., DICKINSON, H. Confirmed dioestrus in pseudopregnant mice using vaginal exfoliative cytology improves embryo transfer implantation rate. **Reproductive BioMedicine**. 31, 538-543, 2015.

MANUAL DE TOXICOLOGIA CLÍNICA, (1ª Ed.), [Organizadores] Edna Maria Miello Hernandez, Roberto Moacyr Ribeiro Rodrigues, Themis Mizerkowski Torres. Orientações para assistência e vigilância das intoxicações agudas. Inseticidas Organoclorados. São Paulo: **Secretaria Municipal da Saúde**, p. 465, 2017.

MARTINEZ, C. A. et al. The overlaying oil type influences in vitro embryo production: differences in composition and compound transfer into incubation medium between oils. **Scientific Reports**.; 7:10505, 2017.

MATTHEWS, S. Baby girl born without eyeball. GMT, 2016. Disponível em: <<https://www.dailymail.co.uk/health/article-3754857/Baby-girl-born-without-eyeball-socket-STRETCHED-make-way-glass-eye-stop-face-drooping.html>> Acesso em: 19 abr. 2020.

Maiores Acidentes nucleares da história. Disponível em: <<http://educacao.globo.com/artigo/maiores-acidentes-nucleares-da-historia.html>> Acesso em: 18 fev. 2020.

MOORE, K. L., PERSAUD, T.V.N., The developing human: clinically oriented embryology. 7ª ed. **Elsevier**. USA, 2003.

MONTOLIU, L. Plug positivo. Disponível em: <https://www.transtechsociety.org/index.php?src=directory&view=images&srctype=images_lister&pos=360,30,384> Acesso em: 05 abr. 2020.

MUKHERJEE, S., LIANG, L., VEISEH, O., Recent Advancements of Magnetic Nanomaterials in Cancer Therapy. **Pharmaceutics**. 147, 2020.

NAGAI, M. L. E. **Estudo da utilização da radiação ionizante para preservação e conservação de filmes fotográficos e cinematográficos.** 2019. 127p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

NAIR, C.K.K., PARIDA, D.K. AND NOMURA T. Radioprotectors in Radiotherapy **J. Radiat. Res.** v. 42. P. 21:37. 2001.

NAKAGATA, N. **Reproductive Engineering Techniques in Mice.** Center for Animal Resources & Development (CARD). Kumamoto University. 2013.

NAKAMURA, N. Why Genetic Effects of Radiation are Observed in Mice but not in Humans. **Radiation Research.** v. 189(2) p.117:127. 2018.

NASCIMENTO, N., SEEBART, C., FRANCIS, B., ROGERO, J.R. AND KAISER, I.I. INFLUENCE OF IONIZING RADIATION ON CROTOXIN: BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS **Toxinology.** v. 34 (1) p. 123:131. 1996.

NASCIMENTO, E., VELASCO, M., Césio 30 anos, **G1**, Goiânia, 2017.

NEGRÓN, A. C. V. **Síntese, caracterização e investigação da potencialidade biológica de carboxilatos dinucleares de Ru, Rh e Cu com nitroimidazóis.** 2005. 319p. Dissertação de Doutorado (Química Inorgânica), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

NEWBOLD, R. R., PADILLA-BANKS, E., JEFFERSON, W.N. Adverse Effects of the Model Environmental Estrogen Diethylstilbestrol Are Transmitted to Subsequent Generations. **Endocrinology.** v. 147 (6) S11–S17. 2005.

NOUAILHETAS, Y. Radiações ionizantes e a vida – 2008 - Apostila Educativa. Comissão Nacional de Energia Nuclear/CNEN/RJ. Disponível em: <<http://www.cnem.gov.br/images/cnen/documentos/educativo/radiacoes-ionizantes.pdf>> Acesso em: 24 abr. 2020.

O Césio ¹³⁷. **Revista Navigator**. Cap. 3, p. 17-18, V.4, N.8, Dez. 2008. Disponível em: <https://www.revistanavigator.com.br/navig8/N8_index.html> Acesso em: 15 fev. 2020.

OKUNO, O. Efeitos biológicos das radiações ionizantes. **Acidente radiológico de Goiânia**, vol.27, nº 77, São Paulo. 2013.

PADOVANI, CARLOS ROBERTO. **Delineamento de experimentos**. São Paulo: Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista, Pró-Reitoria de Graduação, 128 p. 2014.

PAMIES, D., *et al.*, Mechanism-Based Models in Reproductive and Developmental Toxicology, **Elsevier Inc**, pg 135-146, 2011.

PARAJULI, D., KITAJIMA, A., TAKAHASHI, A., TANAKA, H., OGAWA, H., HAKUTA, Y., YOSHINO, H., FUNAHASHI, T., YAMAGUCHI, M., OSADA, M., KAWAMOTO, T. Application of Prussian blue nanoparticles for the radioactive Cs decontamination in Fukushima region. **Journal of Environmental Radioactivity**. v.151, p.233-237. 2016.

PARIA, B. C., REESE, J., Das SANIOY., DEY, S. K., Deciphering the Cross-Talk of Implantation: Advances and Challenges. **PubMed. Science** 296(5576):2185-8, 2002.

PATRA, R., C., Prussian Blue nanoparticles and their analogues for application to cancer theranostics. **Nanomedicine**.11(6), 569-572, 2016.

PLOKHY, S. The True Cost of the Chernobyl Disaster Has Been Greater Than It Seems. **TIME**, April 26. 2018. History Books. Disponível em: <<https://time.com/5255663/chernobyl-disaster-book-anniversary/>>. Acesso em: 22 Abr. 2020.

QIU, L. Q., LAI, W. S., STUMPO, D. J., BLACKSHEAR, P. J. (2016). Mouse Embryonic Fibroblast Cell Culture and Stimulation. **Bio-protocol**. 6(13):1859.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>> Acesso em: 16 jun. 2020.

R Studio Team (2015). R Studio: Integrated Development for R. R Studio, Inc., Boston, MA. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>> Acesso em: 16 jun.2019.

RAMESH C. GUPTA, **Reproductive and Developmental Toxicology**, Book, 2010.

Radiogardase-Cs, 2015. Disponível em: <https://www.heyl-berlin.de/img_upload/pdf/SPC_Radiogardase-Cs-EN_2015-02-1.pdf> Acesso em: 22 jun. 2019.

REVISTA NAVIGATOR. Especial, O Azul da Prússia Cap.17. 2008. Disponível em: < https://www.revistanavigator.com.br/navig8/N8_index.html > Acesso em: 15 fev. 2020.

REVISTA NAVIGATOR. **Efeitos tardios da radiação ionizante**. Cap. 12, p. 51, V4 N. 8. Dez. 2008.

Reproductive Healthcare Ltd. Publicado por **Elsevier Ltd.**.2015.

RIFE 23. Radioactivity in Food and the Environment. 2017: Environment agency; Food Standards Agency; Food Standards Scotland; Natural Resources Wales; Northern Ireland Environment Agency; Scottish Environment Protection Agency: Disponível em: < <https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/rife-23-web.pdf/> > Acesso em: 10 mar. 2020.

RIOS, SANT'ANNA FLAVIA. Transcrição do Desenvolvimento Embrionário do Camundongo: Linha do Tempo do Curso de Medicina Veterinária, UFPR, 2014, Embriologia, 2014. Disponível em: <https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Mouse_Timeline_Detailed > Acesso em: 04 mar.2020.

ROBERTS R. M., Embryo Culture Conditions: What Embryos Like Best., **Endocrinology**, Volume 146, Issue 5, p. 2140- 2141, 2005.

RONDÓN, R. I., PEÑA, T. H., GARCÍA, R. L., CARVAJAL, D. D., PÉREZ, C. M. Y., MASÓ, R. Clinical and surgical management of congenital anophthalmia and microphthalmia. **Revista Cubana de Oftalmología**. v.29, n.4, 2016.

ROSENTHAL, J. J., DE ALMEIDA, C. E., MENDONÇA, A. H., The radiological accident in Goiânia: the initial remedial actions. **Health Physics**, 60(1):7-15. 1990.

RUELA, H. S., BUENO, J. F., FONSECA, E. B., CARMO, A. P. F. T., Azul da Prússia: aspectos químicos, farmacológicos e de eficácia e segurança para uso como medicamento. **Arq Bras Med Naval**. 77(1):38-45, 2016.

SALGADO, A. R., PASSOS, L. A.C. In: Lapchik VB, Matarraia VGM, Ko GM. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. São Paulo: Editora Atheneu; 2009. Reprodução Assistida. p.445-473.

SALGADO, A. R., PASSOS, L. A. C. In: Lapchik VB, Matarraia VGM, Ko GM. (Ed. 2ª). **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. São Paulo: Editora Atheneu; 2017. A criopreservação e a fertilização *in vitro*. p. 95 a 116.

SMITH, T.A., KIRKPATRICK, D.R., SMITH, S., SMITH, T.K., PEARSON, T., KAILASAM, A., HERRMANN, K.Z., SCHUBERTV, J. AND AGRAWAL, D.K. Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation. **Journal of Translational Medicine**. v. 15. P.232. 2017.

SIMOPOULOU, M., *et al.*, Considerations Regarding Embryo Culture Conditions: From Media to Epigenetics, **In Vivo**. 32(3): 451–460, 2018.

SKINER, M.K. Endocrine disruptor induction of epigenetic transgenerational inheritance of disease. Review. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 398, p.4:12. 2014.

SOUZA, C. A., VIGORITO, A. C., ARANHA, F. J. P., OLIVEIRA, G. B., EID, K. A. B., RUIZ, M. A., Terapêutica citoprotetora em pacientes tratados com quimio e/ou radioterapia anti neoplásica, **Revista Brasileira de Hematologia**. vol.22, n.2. São José do Rio Preto. 2000.

SHAW, L. E., GLOVER, D., TURRISI, A. DARREL Q., BROWN, Q., BONNER, H. S., NORFLEET, A. L., WEILER, C., GLICK, J. H., KLIGERMAN, M. M. Pharmacokinetics of WR-2721. **Pharmacology & Therapeutics**. Elsevier. Vol. 39 (1-3), p.195-201, 1988.

TANDON, S.K., PRASAD, S., SINGH, S., Chelation in metal intoxication: influence of cysteine or N-acetyl cysteine on the efficacy of 2,3-dimercaptopropane-1-sulphonate in the treatment of cadmium toxicity. **Journal of Applied Toxicology**. v.22(1). p.67:71. 2002.

TANJI, T. Desastre nuclear na usina de Chernobyl completa 30 anos. Revista Galileu. 26 Abril 2016. Disponível em: <<http://revistagalileu.globo.com/Sociedade/noticia/2015/04/desastre-nuclear-na-usina-de-chernobyl-completa-29-anos.html>> Acesso em: 21 abr. 2020.

TAUHATA, L., SALATI, I. P. A., DI PRINZIO, R., DI PRINZIO, M. A. R. R. **Radioproteção e dosimetria**. Rio de Janeiro: 10ª revisão. IRD/CNEN – Instituto de Radioproteção e Dosimetria/Comissão Nacional de Energia Nuclear, 344p. 2014.

TECNÓLOGO, 2011. Disponível em: <<http://blogtecrad.blogspot.com/search?q=azul+da+pr%C3%BAssia>> Acesso em :18 jan. 2020.

THEILER, K. The House Mouse: Atlas of Embryonic Development. **Springer-Verlag**, 1989.

THOMPSON, F. D., Church, C. O., Prussian Blue for Treatment of Radiocesium Poisoning, **Pharmacotherapy**. 21(11), p. 1364-7. 2012.

UDAN, R.S., DICKINSON, M.E., Imaging mouse embryonic development. **Methods Enzymology**, 76:329-49. 2010.

VAN KESTEREN, R. G., *et al.*, Thallium Intoxication, An Evaluation of Therapy. **Intensiv Medizin**. 17:293-297. 1980.

VEJA. Após 25 anos, Chernobyl ainda é perigo para meio ambiente. *Veja*, 23 Abril 2011. Ciência. Disponível em: <<https://veja.abril.com.br/ciencia/apos-25-anos-chernobyl-ainda-e-perigo-para-meio-ambiente/2011/23/04>> (atualizado em 2016/05/06) Acesso em: 21 abr. 2020.

VILLAVICENCIO, A.L.C.H. **Avaliação do efeito da radiação de ⁶⁰CO na sobrevivência de diferentes linhagens de camundongos: Radiomodificadores e resposta celular**. 1988. 102p. Dissertação (Mestrado em tecnologia nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>> Acesso em: 15 abr. 2019.

VRIJ, A., CREMERS, M.H., LUSTERMANS, A. F., Successful recovery of a Patient with Thallium Poisoning, **Netherlands Journal of Medicine**, 47:121-126, 1995.

WANG, H., DEY, S.K., Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. **Nat Rev Genet** 7: 185-199, *Nature Reviews Genetics* 7(3):185-99; March 2006.

WASSARMAN, P. M., LITSCHER, E. S., Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. **Int J Dev Biol**; 52:665–76, 2008.

WHITTEN. W. K. Culture of Tubal Mouse Ova. **Nature**, 177: 96, 1956.

WHITTEN. W. K., BIGGERS, J. D., Complete development in vitro of the preimplantation stages of the mouse in a simple, chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Fertility**.17:399-401, 1968.

WÜTTKE, W. A., WALZ, W., Sodium- and bicarbonate-independent regulation of intracellular pH in cultured mouse astrocytes. **Neuroscience Letters**, 117.105-110, 1990.

9.ANEXOS



Comissão de Ética no Uso de Animais


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O EMPREGO DO AZUL DA PRÚSSIA PARA PROTEÇÃO DE ANIMAIS IRRADIADOS COM AJUSTES DE DOSES DE COBALTO 60 (CO⁶⁰): UMA ABORDAGEM REPRODUTIVA E GENÉTICA", registrada com o nº 178/16 sob a responsabilidade de NANJI DO NASCIMENTO – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA (CEUA/IPEN) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN–CNEN/SP), em reunião de 24/10/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Janeiro/2017 a Janeiro/2021
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /C57BL/6J <i>Mus musculus</i> / C3H/Hepas <i>Mus musculus</i> /B6H-F1
Nº de animais	260 camundongas
Peso/idade	8 semanas
Sexo	60 Machos e 200 Fêmeas
Origem	Biotério CEMIB/UNICAMP

São Paulo, 9 de novembro de 2016.


Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora da CEUA-IPEN


Prof. Dr. Patrick Jack Spencer
Vice coordenador

IPEN-CNEN/SP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP
Telefone: (011) 3133-9696 - Fax (011) 3133-9709



UNICAMP



CEUA/UNICAMP

INFORMAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP - CEUA/UNICAMP - esclarece que não há necessidade de submeter o projeto de pesquisa "O EMPREGO DO AZUL DA PRÚSSIA PARA PROTEÇÃO DE ANIMAIS IRRADIADOS COM AJUSTES DE DOSES DE COBALTO 60 (CO⁶⁰): UMA ABORDAGEM REPRODUTIVA E GENÉTICA", de responsabilidade do Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos e da pós-graduanda Andréia Ruis Salgado, para análise desta comissão.

Justifica-se por se tratar da análise dos embriões de 02 células cultivadas, como complemento dos experimentos realizados no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares de São Paulo – IPEN/CNEN. O projeto obteve certificado prévio da CEUA do IPEN/CNEN para a realização dos experimentos, com vigência até janeiro de 2021. Não haverá, portanto, na UNICAMP, manipulação *in vivo* para a execução do projeto.

Campinas, 11 de dezembro de 2019.

Prof. Dr. WAGNER JOSÉ FÁVARO
Presidente da CEUA/UNICAMP

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.
