

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 21/02/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E FISIOLÓGICAS
CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO A BAIXAS DOSES DE
RADIAÇÃO IONIZANTE DURANTE O DESENVOLVIMENTO
INTRAUTERINO

Rodrigo Sanchez Giarola

Orientador **Dr. Ney Lemke**

Co-orientador **Dr. Joel Mesa Hormaza**

Co-orientador **Dr. Marcio Luis Acencio**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Processos e Sistemas.

BOTUCATU – SP

2019

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18.618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3880-0780 posgraduação@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Giarola, Rodrigo Sanchez.

Alterações comportamentais e fisiológicas causadas pela exposição a baixas doses de radiação ionizante durante o desenvolvimento intrauterino / Rodrigo Sanchez Giarola. – Botucatu, 2019

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ney Lemke

Coorientador: Joel Mesa Hormaza

Coorientador: Marcio Luis Acencio

Capes: 20904002

1. Proteção Radiológica. 2. Radiologia. 3. Ratos Wistar. 4. Desenvolvimento Fetal. 5. Avaliação Comportamental.

Palavras-chave: Proteção Radiológica; Radiologia; Testes Comportamentais; Wistar; Programação Fetal.

“nanos gigantum humeris insidentes”

(“Anões sentados em ombros de gigantes” – Bernardo de Chartres)

Dedico este trabalho a minha família.

Agradecimentos

Agradeço a todos que ajudaram na elaboração desta tese:

Ao professor Doutor Ney Lemke pelo incentivo, discussões produtivas, pela amizade e orientação;

Ao professor Doutor Joel Mesa Hormaza pela coorientação, pelos “cafés filosóficos” e pela amizade e conversas sobre a física médica;

Ao Doutor Marcio Luis Acencio que mesmo a milhares de quilômetros de distância me coorientou e mostrou muitas vezes o caminho a ser tomado no mundo acadêmico;

Aos meus pais, Luis Carlos e Maria Cecília, a minha irmã, Carolina, e a minha tia Rosangela, por todo amor, incentivo, companheirismo e valorização de todos os esforços da vida acadêmica;

À minha namorada, Marina, pelo companheirismo, encorajamento e compreensão;

A todos funcionários do Departamento de Física e Biofísica, os quais em diversos momentos me apoiaram tecnicamente;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro recebido durante a realização deste trabalho;

A todos amigos e companheiros do laboratório de Bioinformática e Biofísica Computacional do Departamento de Física e Biofísica, especialmente à Tahila e o Rafael, pelas conversas científicas e da vida de pós-graduando;

A todos os companheiros de pós-graduação do Departamento de Física e Biofísica, em especial ao Fábio Florença, Guilherme Salvador e Luiz Bovolenta com os quais tive importantes conversas sobre a área acadêmica e pessoal;

Aos professores Marcos Roberto Mattos Fontes, Vladimir Eliodoro Costa, Roberto Morato Fernandez, Paulo Roberto Rodrigues Ramos, Mário de Oliveira Neto e José Luiz Rybarczyk Filho pela oportunidade de ministrar aulas durante meu doutorado além da convivência e conversas sobre a ciência;

Ao professor Marco Antônio Rodrigues Fernandes pelos diversos momentos em que me acompanhou e guiou pelo mundo da física médica, além da amizade e as diversas oportunidades de ministrar aulas na pós-graduação;

Ao professor Helton Carlos Delicio do Departamento de Fisiologia pela participação ativa no projeto com os animais, além da amizade;

Ao professor Luiz Carlos Vulcano da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pelo apreço com a ciência;

Ao professor Antônio Francisco Godinho do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) pela disposição em ensinar um físico médico os métodos de pesquisa que envolvem aspectos comportamentais de animais;

Por fim, a todos meus amigos que se fizeram presentes.

Resumo

Os efeitos biológicos da radiação ionizante são causados pela deposição de energia no tecido. Efeitos de baixas doses de radiação ionizante induzem consequências de longo alcance, especialmente durante desenvolvimento intrauterino. Os riscos de exposição *in utero* permanecem controversos na literatura e nenhum efeito biológico é relatado em doses abaixo de 50 mGy. Modelos animais são frequentemente utilizados para investigação dos efeitos biológicos das radiações ionizantes pois permitem a manipulação de diversas configurações experimentais. Esse trabalho investigou o impacto da exposição intrauterina a baixa dose de radiação ionizante no desenvolvimento pós-natal de ratos. Ratas Wistar foram expostas a 15 mGy de raios X nos dias gestacionais 8 e 15, respectivamente o início e o fim da fase organogênese. Quatro animais machos foram selecionados de cada ninhada para o estudo. Nos recém-nascidos foram realizados o teste de abertura dos olhos e o teste de geotaxia negativa. Nas idades pós-natais de 30 e 70 dias, jovens e adultos, os animais foram testados no teste de campo aberto, no labirinto em cruz elevado e *hole board*. Avaliou-se o ganho de peso de todos os animais ao longo de todo experimento. Através dos resultados das avaliações identificou-se menor ganho de peso dos ratos expostos durante o desenvolvimento fetal quando adultos. Foram encontradas fortes evidências de alterações comportamentais e prejuízos no sistema nervoso central, também, observou-se comprometimento da coordenação motora em ratos expostos durante o desenvolvimento intrauterino. O presente estudo constatou que um valor de exposição considerado seguro produz efeitos deletérios na prole exposta durante o desenvolvimento intrauterino.

Abstract

Low-dose ionizing radiation may induce far-reaching consequences in human, especially regarding intrauterine development. Many studies have documented that the risks of in utero irradiation remain controversial and no effect is reported at doses below 50 mGy. Animal models are often used to clarify the non-fully understood impact of intrauterine irradiation and allow the manipulation of several experimental setups, making possible the analysis of a wide range of end points. We investigated the impact of in utero low-dose X-ray irradiation on postnatal development in rat offspring through a set of well-established behavioral parameters and weight gain. We exposed pregnant Wistar to 15 mGy of X-rays, which is a low-dose value into diagnostic range that can be achieved in a single radiological exam, on gestational days 8 and 15 and control. Four male animals were select from each litter. At infant age, eye-opening test and negative geotaxis tests were performed. Animals were tested at postnatal ages 30 and 70 days in open field, elevated plus-maze, and hole board tests. We evaluated the weight gain of all animals throughout the experiment. Our results present difference between irradiated and non-irradiated: lower weight gain when adults, impairments in the central nervous system since infant phase, behavioral changes persisting later into life and impairment of motor coordination in irradiated animals. The present study found that even low-doses exposure, considered safe, during pregnancy were able to induce behavioral impairment and lower weight gain in rat's offspring.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS E OBJETIVOS	1
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	4
2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DAS RADIAÇÕES IONIZANTES	4
2.2 RADIAÇÃO IONIZANTE	6
2.2.1 EQUIPAMENTOS EMISSORES DE RAIOS X	7
2.2.2 RADIAÇÃO NATURAL	8
2.2.3 EXPOSIÇÃO DO SER HUMANO	9
2.3 GRANDEZAS FÍSICAS DAS RADIAÇÕES IONIZANTES	10
2.3.1 EXPOSIÇÃO (X).....	10
2.3.2 DOSE ABSORVIDA (D)	10
2.3.3 KERMA (K)	11
2.3.4 DOSE EQUIVALENTE (H)	12
2.3.5 DOSE EFETIVA (E).....	12
2.3.6 EQUIVALENTE DE DOSE	13
2.4 DETECTORES DE RADIAÇÃO IONIZANTE	13
2.4.1 CÂMARA DE IONIZAÇÃO	14
2.5 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA	14
2.5.1 EFEITO FOTOELÉTRICO.....	15
2.5.2 EFEITO COMPTON	16
2.5.3 PRODUÇÃO DE PARES.....	17
2.5.4 EFEITO RAYLEIGH	18
2.5.5 TRANSFERÊNCIA LINEAR DE ENERGIA.....	18
2.6 EFEITOS BIOLÓGICOS DAS RADIAÇÕES IONIZANTES	19
2.6.1 NATUREZA DOS EFEITOS BIOLÓGICOS	21
2.6.2 LEI DA RADIOSSENSIBILIDADE.....	22
2.6.3 EFICÁCIA BIOLÓGICA RELATIVA	22
2.6.4 ESTÁGIOS DA AÇÃO.....	23
2.6.5 CICLO CELULAR.....	23
2.7 PROTEÇÃO RADIOLÓGICA.....	25
2.7.1 JUSTIFICATIVA.....	25
2.7.2 OTIMIZAÇÃO DA PRÁTICA	25
2.7.3 LIMITE DE DOSE.....	26
2.7.4 CONTROLE DE EXPOSIÇÃO	27
2.8 RISCOS INERENTES DA GESTAÇÃO HUMANA	28
2.9 NORMAS PARA USO DE RADIAÇÕES IONIZANTES	29
2.10 EQUIPAMENTOS EMISSORES DE RAIOS X NO BRASIL	33
2.11 USO DE ANIMAIS EM PESQUISAS COM RADIAÇÕES IONIZANTES.....	35
2.11.1 RATOS WISTAR	37

3. <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	38
3.1 PRINCÍPIOS ÉTICOS PARA O USO DE ANIMAIS.....	39
3.2 ANIMAIS E SELEÇÃO DOS GRUPOS	39
3.3 IRRADIAÇÃO E ACOMPANHAMENTO PÓS-NATAL.....	40
3.4 AVALIAÇÃO DE RESPOSTA FISIOLÓGICA E DESENVOLVIMENTO FÍSICO	44
3.4.1 TESTE DE ABERTURA DOS OLHOS.....	44
3.4.2 TESTE DE GEOTAXIA NEGATIVA	45
3.4.3 FORMAÇÃO DE NINHOS	46
3.5 AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL	47
3.5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	47
3.5.2 TESTE DE ARENA DE CAMPO ABERTO	48
3.5.3 TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	49
3.5.4 TESTE DE <i>HOLE BOARD</i>	51
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4. <u>RESULTADOS</u>	52
4.1 AVALIAÇÃO DAS FÊMEAS F0	52
4.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA NO PESO CORPORAL PÓS-NATAL.....	54
4.3 DESENVOLVIMENTO NEUROLÓGICO PRECOCE	55
4.4 ANSIEDADE DOS ANIMAIS F1.....	56
5. <u>DISCUSSÃO</u>	61
5.1 EFEITOS DA IRRADIAÇÃO NAS FÊMEAS F0	61
5.2 PESO CORPORAL PÓS-NATAL EM ANIMAIS EXPOSTOS	61
5.3 DESENVOLVIMENTO NEUROLÓGICO E MOTOR DE RECÉM-NASCIDOS	62
5.4 TRANSTORNOS COMPORTAMENTAIS EM ANIMAIS EXPOSTOS	63
5.5 EFEITOS DA IRRADIAÇÃO INTRAUTERINA EM RATOS WISTAR.....	65
6. <u>CONCLUSÕES</u>	67
<u>REFERÊNCIAS</u>	69

Lista de Figuras

Figura 1: Capa do artigo publicado por Roentgen no “Tratado da sociedade de Física Médica para Wuzburg – Um novo tipo de raios” em 1896 e o registro da primeira radiografia, obtida em 22/12/1895, da mão esquerda de Anna Bertha Roentgen	5
Figura 2: Gráfico adaptado da distribuição de doses a que o ser humano está exposto.....	9
Figura 3: Representação do Efeito Fotoelétrico	16
Figura 4: Representação do Efeito Compton.....	17
Figura 5: Representação da Produção de Pares	17
Figura 6: Gráfico da prevalência dos processos de absorção dos fótons de raios X com a matéria em função da energia do fóton em MeV e do número atômico Z do material absorvedor.....	18
Figura 7: Representação das fases do ciclo celular	24
Figura 8: Foto de um rato Wistar macho com 20 dias de idade	37
Figura 9: Disposição das caixas de animais alocados durante o experimento	39
Figura 10: Microscópio utilizado para visualização e imagem da lâmina obtida com teste de esfregaço.	40
Figura 11: Posicionamento dos animais durante a exposição, detalhe do dispositivo de contenção para irradiação do animal	41
Figura 12: Imagem radiológica de uma das ratas durante o 15º dia de gestação.....	42
Figura 13: Medidas de Kerma no ar do aparelho de raios X	43
Figura 14: Dinamômetros utilizados para pesagem de animais recém-nascidos (esquerda) e adultos (direita).....	44
Figura 15: Checagem do Teste de Abertura de Olhos, animal com 6 dias de idade e olhos ainda fechados.....	45
Figura 16: Animal recém-nascido no Teste de Geotaxia Negativa e uma sequência de fotos na qual o animal realiza a virada.....	46
Figura 17: Modelo utilizado para marcar o posicionamento do ninho durante avaliação diária das ratas F0 com os filhotes F1	46
Figura 18: Dispositivo de teste da Arena de Campo Aberto	49
Figura 19: Dispositivo de teste do Labirinto Arena em Cruz Elevado	50
Figura 20: Dispositivo de teste do <i>Hole Board</i>	51
Figura 21: Evolução do peso das ratas F0 antes e depois do parto (n = 36, 12 fêmeas por grupo)	53
Figura 22: Distribuição percentual dos ninhos das fêmeas F0 dos grupos Controle (CTL), Irradiadas no 8º dia de gestação (IR8d) e Irradiadas no 15º dia de gestação (IR15d) durante o período antes do desmame (total de 720 anotações, ninhos de 12 fêmeas por grupo anotados durante 20 dias)	54
Figura 23: Gráfico do peso corporal médio de animais F1 irradiados (IR8d e IR15d) e controle (CTL) em relação à idade em dias.....	55

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação dos feixes de raios X em termos de tensão de aceleração dos elétrons que os produzem.....	7
Tabela 2: Valores de LET para alguns tipos de radiação e energia.....	19
Tabela 3: Limites Primários Anuais de Doses (CNEN-NE-3.01), para fins de controle administrativo efetuado pela CNEN, o termo dose anual deve ser considerado como dose no ano calendário, isto é, no período decorrente de janeiro a dezembro de cada ano	26
Tabela 4: Níveis de referência de radiodiagnóstico por radiografia para paciente adulto típico (disponível no Anexo A – Níveis de referência de radiodiagnóstico da portaria 453/98).....	31
Tabela 5: Níveis de referência de radiodiagnóstico em CT para paciente adulto típico (disponível no Anexo A – Níveis de referência de radiodiagnóstico da portaria 453/98).....	32
Tabela 6: Distribuição dos equipamentos médicos para imagem no Brasil, dados obtidos do Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde (CNES-DATASUS) em janeiro de 2019	34
Tabela 7: Projeção da população brasileira para cada região do país de acordo com o IBGE em janeiro de 2019 (disponível em: https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/).....	34
Tabela 8: Porcentagem da população, equipamentos de raios X diagnóstico e ultrassom para cada região do país em janeiro de 2019	35
Tabela 9: Peso corporal médio de ratas antes e depois do parto, tamanho da ninhada e duração da gestação, descritos para animais irradiados e controle	53
Tabela 10: Peso corporal médio de animais F1 irradiados (IR8d e IR15d) comparados aos pesos de animais F1 controle (CTL).....	55
Tabela 11: Testes de neurodesenvolvimento em ratos recém-nascidos dos grupos controle (CTL) e irradiados (IR8d e IR15d).....	56
Tabela 12: Comportamento no teste de Arena de Campo Aberto para animais irradiados durante desenvolvimento intrauterino (IR8d e IR15d) e animais controle (CTL), para ratos jovens (30 dias de idade) e adultos (70 dias de idade)	58
Tabela 13: Comportamento no teste de Labirinto em Cruz Elevado para animais irradiados durante desenvolvimento intrauterino (IR8d e IR15d) e animais controle (CTL), para ratos jovens (30 dias de idade) e adultos (70 dias de idade)	59
Tabela 14 : Porcentagens para parâmetros avaliados em ratos jovens (30 dias de idade) e adultos (70 dias de idade) no teste de LCE para animais irradiados durante desenvolvimento intrauterino (IR8d e IR15d) e animais controle (CTL)	60
Tabela 15: Comportamento no teste de <i>Hole Board</i> para animais irradiados durante desenvolvimento intrauterino (IR8d e IR15d) e animais controle (CTL), para ratos jovens (30 dias de idade) e adultos (70 dias de idade).....	61

1. Introdução

1.1 Considerações iniciais e objetivos

O uso da radiação ionizante para diagnóstico médico por imagem deu-se no fim do século XIX e, através de constante incorporação tecnológica, trouxe benefícios impactantes na área médica. Entretanto, os riscos inerentes da técnica e a crescente demanda por esse tipo de exame requerem que a proteção radiológica seja efetivamente aplicada à rotina clínica, para mitigação dos riscos. Os efeitos biológicos das radiações ionizantes são estudados desde o início de seu uso e sabe-se que os riscos dependem de fatores relacionados ao tipo de radiação ionizante utilizada e do meio biológico exposto. Mesmo com os diversos estudos na área da radiobiologia ainda há lacunas e muitas incertezas sobre os reais efeitos das baixas doses devido a sua difícil avaliação. Órgãos internacionais e nacionais estabelecem recomendações, guias e instruções normativas sobre o uso de equipamentos, valores máximos permitidos e valores de referência para os exames.

As exposições médicas para diagnóstico apresentam, de maneira geral, baixos valores de dose e como consequência o meio médico acaba por não desenvolver muitas pesquisas na área; um caso específico, mas de extrema importância, é a exposição de fetos e embriões durante o desenvolvimento intrauterino. Apesar de amplamente aceito pela comunidade científica que mulheres grávidas não devem ser expostas à radiação ionizante, existem situações nas quais podem haver a exposição.

Devido a condições maternas e fetais, nas quais pode haver risco para a saúde da mãe, ou ainda se o quadro clínico da paciente demandar, pode haver indicação de se realizar imagens radiológicas. Vale ressaltar que a irradiação de gestantes para fins diagnósticos demanda pleno acordo entre os profissionais envolvidos, a própria paciente e deve-se aplicar medidas efetivas para proteção radiológica, visando a maior redução possível da dose. Muitas gestantes também não sabem ou escondem a gestação da equipe médica e técnica por diversos motivos, situação que pode levar a exposição indesejada. Também, quando a gestante é paciente de trauma (maior causa não obstétrica de morte materna ¹, pode ocorrer de estar impossibilitada de informar sua gestação ou mesmo desconhecer-la, o que acaba sendo um fator de risco, já que em 1978 foi implementado o

conceito de “*Advanced Trauma Life Support*” (ATLS). O ATLS é um guia padronizado para atendimento de pacientes de trauma, o qual preconiza que médicos radiologistas procedam protocolos de exames radiológicos em pacientes que sofreram traumatismo, incluindo imagem radiológica da região pélvica ². Finalmente, têm-se as mulheres que trabalham com radiação ionizante (indivíduos ocupacionalmente expostos - IOEs) que, mesmo com as normas vigentes, podem acabar sendo expostas quando grávidas.

É recomendado que mulheres com suspeita de gravidez, ou gestantes, que necessitem exames de diagnóstico por imagem utilizem métodos alternativos que não façam uso das radiações ionizantes, como, por exemplo a ultrassonografia (US) e a ressonância nuclear magnética (RNM). No entanto, apesar da recomendação, é comum a indisponibilidade desses equipamentos em parte da rede de saúde no país, acarretando por vezes na impossibilidade de acesso.

Enquanto os efeitos biológicos associados a altas doses de radiação ionizante (> 100mGy) em humanos durante exposição pré-natal têm sido amplamente investigados ³, estudos relatando os efeitos biológicos para baixas doses de radiação ionizante (\leq 100 mGy ou taxa de dose inferior a 5 mGy/h- segundo *National Radiological Protection Board*) são escassos e a interpretação de seus resultados geralmente é controversa ⁴⁻¹⁰. O estudo pioneiro conduzido pela médica epidemiologista Alice Stewart, em 1958, buscava descobrir o aumento da incidência de morte devido ao câncer infantil em jovens de classe alta. A fim de explicar essa disparidade, já que grande parte das doenças infantis são mais difundidas em classes baixas, ela investigou padrões e notou que metade das crianças que haviam morrido de câncer infantil foram irradiadas por raios X durante o desenvolvimento intrauterino ^{7, 10}. Esta primeira publicação inspirou e conduziu outras pesquisas a realizarem estudos com o objetivo de estabelecer uma correlação sólida entre as baixas doses de radiação ionizante, provindas de procedimentos de diagnóstico por imagem durante a gestação, e a ocorrência de efeitos adversos à saúde no crescimento e desenvolvimento infantil.

Eventos que podem levar à redefinição de parâmetros fisiológicos importantes durante o desenvolvimento intrauterino são chamados de *programação fetal*, e geralmente, esses efeitos negativos são esperados devido ao estresse oxidativo induzido pela radiação ionizante. A radiação ionizante pode produzir ionização direta no DNA afetando sua funcionalidade ou até mesmo destruir o DNA, pode também produzir efeitos por mecanismo indireto depositando energia no ambiente biológico e desencadear a

produção de radicais livres reativos que, por sua vez, aumentam o estresse oxidativo celular. O estresse oxidativo celular pode causar alterações fenotípicas celulares que podem predispor o feto a certos fenótipos pós-natais. Portanto, para evitar esses possíveis efeitos de programação fetal negativos, é preferível não expor os tecidos do embrião e do feto à radiação ionizante.

Não é possível realizar experimentos controlados para investigar os efeitos de baixas doses de radiação ionizante em gestantes por razões éticas, morais e científicas, descritas inclusive pelo código internacional de Nuremberg (1947) e pela declaração de Helsinki (1964), que apresentam preceitos para pesquisas médicas envolvendo seres humanos¹¹. Existem, no entanto, metodologias alternativas que provém dados confiáveis, reproduzíveis e que podem servir como referência para dados em seres humanos.

Esses valores são, então, estimados através de estudos epidemiológicos de grupos de humanos expostos, como a população que sofreu o bombardeio de Hiroshima e Nagasaki^{12,13}, por extrapolação de resultados experimentais realizados através de células *in vivo* e *in vitro*, além dos dados obtidos através de ferramentas computacionais e de pesquisas que utilizam animais.

Diversos estudos foram realizados sobre a irradiação de ratas prenhas, mas, geralmente, o intervalo de radiodiagnóstico (<50 mGy) não está relacionado ao risco aumentado de anomalias congênitas^{14,15}. De Santis *et al.*¹⁴ discutem que as doses utilizadas em estudos com animais são geralmente superiores às doses utilizadas em procedimentos diagnósticos humanos.

A pesquisa de D'ippolito e Medeiros⁴ relata que a exposição a doses de radiação abaixo de 50 mGy não está associada ao risco aumentado de aborto, anomalias congênitas, retardo mental ou mortalidade neonatal. Também, Cohen *et al.*¹⁶ estudando grupos de gestantes expostas a procedimentos diagnósticos radiológicos durante a gestação, mostraram que a taxa de nascidos vivos foi maior e a taxa de abortos espontâneos menor no grupo de baixa dose (< 1,0 mGy durante a gestação) do que no grupo de alta dose. Adicionalmente concluem que o limite para efeitos como retardo de crescimento e teratogênese é de 200 mGy¹⁶, enquanto o relatório número 174 do *National Council on Radiation Protection* (NCRP) estabelece como limite de dose 50 mGy durante a gestação¹⁷. Não há atualmente disponível nenhum limite bem estabelecido para valor de baixas doses que induzem efeitos negativos na prole^{5,8}. A radiação ionizante pode induzir efeitos negativos de programação fetal em níveis de exposição diagnósticos?

O objetivo principal deste trabalho foi exatamente responder essa questão. Para tanto, foram examinadas as alterações fisiológicas e comportamentais de ratos Wistar expostos a baixa dose de radiação ionizante (15 mGy) durante duas fases do desenvolvimento intrauterino. A dose de exposição foi definida em 15 mGy, porque é um valor, na faixa de diagnóstico, que pode ser alcançado em um único exame radiológico pelo embrião e feto. Foram estabelecidos o 8º e o 15º dia de gestação para investigação neste trabalho, pois, nos ratos Wistar esses dias representam, respectivamente, o início e o final da organogênese, período mais sensível da gestação a efeitos da radiação ionizante¹⁸. Também, objetivou-se avaliar se os efeitos teratogênicos das baixas doses de radiação ionizante podem levar à restrição de crescimento intrauterino, além de efeitos letais, malformações, alterações estruturais e retardo mental. Para tanto, foi necessária uma análise aprofundada dos dados já existentes na literatura, incluindo efeitos biológicos e os riscos inerentes de uma gestação.

O apêndice 1 apresenta o trabalho submetido para publicação na revista *Scientific Reports* em 2018 que está em fase de revisão.

6. Conclusões

Esse trabalho apresenta uma forte evidência de que a exposição intrauterina desencadeia efeitos deletérios mesmo para um valor de dose considerado seguro. Não havia sido reportado nenhum efeito para exposições intrauterinas com valores de dose abaixo de 50 mGy. Nesse trabalho, uma exposição de 15 mGy de radiação ionizante X induziu menor ganho de peso dos animais quando adultos, houve prejuízo no sistema nervoso central desde a fase infantil, as alterações comportamentais persistiram na fase adulta e houve perda de coordenação motora dos animais expostos. O grande número de animais acompanhado desde a prenhez das mães até a fase adulta permitiu uma avaliação precisa dos animais irradiados, dos animais controle e a comparação entre ambos.

Os animais irradiados no início da fase de organogênese apresentaram efeitos mais severos do que os animais irradiados na fase final da organogênese, corroborando com a literatura que descreve que o início da organogênese apresenta maior radiosensibilidade, entretanto, todos os animais irradiados apresentaram alterações. Possivelmente houve uma reprogramação fetal dos animais.

É importante o estudo dos efeitos causados por baixas doses de radiação ionizante, os efeitos deletérios produzidos e a verificação do potencial nocivo para seres humanos. Especialmente porque há um aumento na dose coletiva devido principalmente ao maior número de exposições para diagnóstico médico. A falta de informação em relação aos efeitos biológicos deletérios para baixas doses pode levar a uma percepção errônea do risco; portanto, deve-se aperfeiçoar e implementar de maneira efetiva a proteção radiológica mesmo para baixos valores de dose.

As informações obtidas em pesquisas de baixas doses podem ajudar os profissionais da área da saúde a avaliar os riscos da exposição aos raios X diagnósticos durante uma gestação dada uma situação clínica devido a condições maternas e fetais. As informações instruem quanto à correta tomada de decisão para a escolha do melhor procedimento diagnóstico em uma dada situação clínica, garantindo a segurança da paciente e do feto.

Esse trabalho apresenta dados que corroboram com a recomendação de não realização de exames diagnósticos que utilizem raios X em gestantes e também das IOE. É mandatório que novos estudos sejam realizados para baixos valores de doses, principalmente para a compreensão dos mecanismos que desencadeiam os efeitos descritos.

Referências

- 1) Hoffmeister, S.M.C., Ramos, J.G.L. & Serrano, Y.L.G Trauma na gestação. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. [online]. 2005, vol.27, n.9, pp.505-508. Available from: ISSN 0100-7203. Doi:10.1590/S0100-72032005000900001. (2018)
- 2) Kool DR, Blickman JG. Advanced Trauma Life Support®. ABCDE from a radiological point of view. *Emergency Radiology*; 14(3):135-141. doi:10.1007/s10140-007-0633-x. (2007)
- 3) Little, M., Wakeford, R., Tawn, E., Bouffler, S. & Berrington de Gonzalez, A. Risks associated with low doses and low dose rates of ionizing radiation: why linearity may be (almost) the best we can do. *Radiology* 251, 6-12 (2009).
- 4) D'ippolito, G. & Medeiros, R.B. Exames radiológicos na gestação. *Radiol Bras.* 38, 447-450 (2005).
- 5) Sreetharan, S. et al. Ionizing radiation exposure during pregnancy: effects on postnatal development and life. *Radiation Research* 187, 647-658 (2017).
- 6) Kriegel, H., Schmahl, W., Gerber, G. & Stieve, F. Radiation risks to the developing nervous system (New York: Fischer G.) 761-762 Stuttgart. (1986).
- 7) Stewart, A., Webb, J., Giles, D. & Hewitt D. Preliminary communication: malignant disease in childhood and diagnostic irradiation in-utero. *The Lancet* 268, 447 (1956).
- 8) Schull, W. & Otake, M. Cognitive function and prenatal exposure to ionizing radiation. *Teratology* 59, 222-226 (1999).
- 9) Wakeford, R. & Tawn, E. The meaning of low dose and low dose-rate. *J Radiol Prot* 30, 1-3 (2010).
- 10) Knox, E., Stewart, A., Kneale, G. & Gilman, E. Prenatal irradiation and childhood cancer. *J Soc Radiol Prot.* 7, 177-189 (1987).
- 11) Andrade, M.L., Silva, O.S., Duarte, M.R., Ferreira, L.F.B., Dias, O.V., Costa, S.M. Código de Nuremberg e Declaração de Helsinki [Internet]. 2013 [acesso em 29 dez. 2017]. Disponível em: <http://www.efdeportes.com/efd183/codigo-de-nuremberg-e-declaracao-de-helsinki.htm>
- 12) Neriishi K., Nakashima E., Minamoto A., Fujiwara S., Akahoshi M., Mishima H.K., Kitaoka T. and Shore R. E., Postoperative cataract cases among atomic bomb survivors: radiation dose response and threshold. *Radiat. Res.* 168, 404-408 (2007).
- 13) Otake, M. & Schull, W. Radiation-related small head sizes among prenatally exposed A-bomb survivors. *Int J Radiat Biol* 63, 255-270 (1993).
- 14) De Santis, M. et al. Radiation effects on development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 81, 177-182 (2007).
- 15) De Santis, M. et al. Ionizing radiations in pregnancy and teratogenesis: a review of literature. *Reprod Toxicol* 20, 323-329 (2005).
- 16) Cohen-Kerem, R. et al. Diagnostic radiation in pregnancy: perception versus true risks. *J Obstet Gynaecol Can.* 28, 43-48 (2006).
- 17) Preconception and prenatal radiation exposure: health effects and protective guidance. Report No.174. National Council on Radiation Protection and Measurements, NCRP. (2013).
- 18) Kimler, B. & Norton, S. Behavioral changes and structural defects in rats irradiated in utero. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 15, 1171-1177 (1988).
- 19) Giarola, R.S. Estudo teórico experimental da resposta radiométrica de câmaras de ionização utilizadas em dosimetria em feixes de raios X para diagnóstico radiológico. Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), São Paulo, (2014).
- 20) Hugh, T.B. «Howard Florey, Alexander Fleming and the fairy tale of penicillin». *The Medical Journal of Australia.* 177 (1): 52-53; author 53 53. PMID 12436980 (2002).
- 21) Duriez Y., et al. Production of X-rays – Applications to medical Radiography. Madison: University of Wisconsin; 1978.
- 22) Okuno, E., Yoshimura, E.M.. “Física das Radiações”. São Paulo: Oficina de Textos, (2010).
- 23) Segreto, H.R.C., Held, H.C., Michael, B.D. and Segreto, R.A. Radiobiologia – Da bancada a clínica. São Paulo: Scortecci. (2016).
- 24) Tauhata, L., Salati, I.P.A., Prinzio, R.D., Prinzio, M.A.R.R.D.. “Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos – 5ª revisão agosto/2003 – Rio de Janeiro- IRD/CNEN.(2003).
- 25) Khan, F.M. “The physics of radiation therapy”. 2. Ed. Baltimore, MD. Willians, (1994).
- 26) Scaff, L.A.M. “Física da Radioterapia. A base analógica de uma era digital”. Editora Projeto Saber. São Paulo – SP. (2010).
- 27) Quadrado, A.A. Princípios de Dosimetria das Radiações. Instituto Militar de Engenharia [CEN-1] (1962).
- 28) National Council on Radiation protection and Measurements. Ionizing radiation exposure of the population of the United States. NCRP Report No. 160. Bethesda, MD: National Council on Radiation Protection and Measurements. (2009).
- 29) Vivolo V. Desenvolvimento de um Sistema de Referência para Determinação do Equivalente de Dose Pessoal e da Constância de Feixes de Radiação X. Tese (Doutorado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), São Paulo: IPEN, (2006).
- 30) Spiers, F.W. Radiation Dosimetry. Proceedings of the International School of Physics Enrico Fermi. Academic Press (NY and London) (1964).
- 31) Johns, H.E. & Cunnighan, J.R.. “The Physics of Radiology”. 4.ed. Springfield, Illinois, Charles C. Thomas Publisher. (1983).
- 32) Podgorsak, E.B. Technical Editor. “Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students”. Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA). Vienna. (2005).
- 33) Okuno, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. *Estud. av.*, São Paulo, v. 27, n. 77, p. 185-200, 2013. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=

- S010340142013000100014&lng=en&nrm=iso>. Access on 14 May. 2018. [\(2013\)](http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142013000100014).
- 34) Dance, D.R., Christofides, A.D.A., Maidment, I.D., McLean, K.H. *Diagnostic Radiology Physics: A Handbook for Teachers and Students* (<http://www-pub.iaea.org/books/LAEABooks/8841/Diagnostic-Radiology-Physics>) (2014).
 - 35) Okuno, E. *As bombas atômicas podem dizimar a humanidade - Hiroshima e Nagasaki, há 70 anos. Estud. av., São Paulo*, v. 29, n. 84, p. 209-218. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142015000200209&lng=en&nrm=iso>. access on 10 Jan. 2019. [\(2015\)](http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142015000200014).
 - 36) Douple, E. B., Mabuchi, K., Cullings, H. M., Preston, D. L., Kodama, K., Shimizu, Y., ... Shore, R. E. *Long-term Radiation-Related Health Effects in a Unique Human Population: Lessons Learned from the Atomic Bomb Survivors of Hiroshima and Nagasaki. Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, 5(0 1), S122–S133. [\(2011\)](http://doi.org/10.1001/dmp.2011.21).
 - 37) *The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. ICRP. Ann. ICRP 37 (2-4) (2007)*.
 - 38) Bergonié, J. & Tribondeau, L. *Interpretation of some results from radiotherapy and an attempt to determine a rational treatment technique. Radiat Res.* 11, 587-588 (1959).
 - 39) Resolução CNEN-114/2011 —Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica, de 01 de setembro de 2011. Norma CNEN-NN-3.01. (2011).
 - 40) SECRETARIA DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA (SVS) DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 453 de 01 de junho de 1998- Diretrizes de Proteção Radiológica em Radiodiagnóstico Médico e Odontológico. Publicada no D.O.U. nº103-E. Brasília-DF. (1998).
 - 41) Nussbaum, R.L., McInnes, R.R.; Willard, H.F. THOMPSON & THOMPSON: *Genética Médica*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (2002).
 - 42) Robles, A.F. *Da gravidez de "risco" às "maternidades de risco". Biopolítica e regulações sanitárias nas experiências de mulheres de camadas populares de Recife. Physis [online]. 2015, vol.25, n.1 [cited 2019-01-15], pp.139-169. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-73312015000100139&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0103-7331. [\(2015\)](http://dx.doi.org/10.1590/S0103-73312015000100009).*
 - 43) Ciari Junior, C. ,Almeida, P.A.M. *Elementos de avaliação do "risco gravídico". Rev. Saúde Pública, São Paulo*, v. 6, n. 1, p. 57-78, Mar. 1972 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101972000100007&lng=en&nrm=iso>. access on 15 Jan. 2019. [\(1972\)](http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101972000100007).
 - 44) Peralta, C.F.A., Barini, R. *Ultrassonografia obstétrica entre a 11ª e a 14ª semanas: além do rastreamento de anomalias cromossômicas. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. [online]. 2011, vol.33, n.1 [citado 2019-01-15], pp.49-57. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032011000100008&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0100-7203. [\(2011\)](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032011000100008).*
 - 45) Brizot, M.L.; Zugaib, M. *A translucência nucal deve ser solicitada na rotina pré-natal?. Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo*, v. 49, n. 4, p. 356, 2003 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302003000400013&lng=en&nrm=iso>.access on 14 Aug. 2018. [\(2003\)](http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302003000400013).
 - 46) Attix FH. *Introduction on radiological physics and radiation dosimetry. 2nd ed. New York, NY: John Wiley & Sons, (1986)*.
 - 47) Kaplan I. *“Nuclear Physics”*. 2. Ed. Massachusetts Institute of Technology, Addison-Wesley, (1971).
 - 48) Secretaria de Atenção à saúde [Internet]. *Indicadores [acesso 20 jan 2019]. Disponível em: http://cnes.datasus.gov.br/Mod_Ind_Equipamento.asp?VEstado=00*
 - 49) IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019. *Resultado dos Dados Preliminares do Censo – 2019. <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/> (2019)*.
 - 50) Snowdon, C. T. *O significado da pesquisa em Comportamento Animal. Estud. psicol. (Natal), Natal*, v. 4, n. 2, p. 365-373, Dec. (1999).
 - 51) Ennaceur, A. *Tests of unconditioned anxiety – pitfalls and disappointments. Physiology and Behaviour* 135, 55-71 (2014).
 - 52) Hall, C. S. *Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. Journal of Comparative Psychology*, 18(3), 385-403.(1934).
 - 53) Nguyen, A., Armstrong, E. & Yager, J. *Neurodevelopmental reflex testing in neonatal rat pups. J Vis Exp. doi:10.3791/55261.(2017)*.
 - 54) Hill, M.A. *Embryology Carnegie Stages. Preprint at https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie_Stages (2018)*.
 - 55) Norton, S. *Significance of sex and age differences. Animal models in psychiatry and neurology. (Maser, J. & Seligman, M.) 474 Pergamon Press. (1977)*.
 - 56) Schull, W., Norton, S., Jensch, R. *Ionizing radiation and the developing brain. Neurotoxicol Teratol.* 12, 249-260 (1990).
 - 57) Baker DE. *Reproduction and breeding. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH, editors. The Laboratory Rat, Biology and Diseases. I. New York: Academic Press. pp. 154–68. (1979)*.
 - 58) Agnish, N. & Keller, K. *The rationale for culling of rodent litters. Toxicological Sciences* 38, 2-6(1997).
 - 59) Festing S., Wilkinson R. *The ethics of animal research. Talking Point on the use of animals in scientific research. EMBO Rep.*;8(6):526-30 (2007).

- 60) Alder, S. & Zbinden, G. Methods for the evaluation of physical, neuromuscular and behavior development of rats in early postnatal period in *Methods in prenatal toxicology* (Georg Thieme Publishers) 175-185 (Neubert, D., Merker, H., Kwasigroch, T. editors) (1977).
- 61) Anselmo, F. Effects of gestational exposure to the cadmium and dimethoate on the behavior of anxiety in rats offspring Pós graduação em farmacologia e Biotecnologia dissertação mestrado – farmacologia. (2016).
- 62) Oliveira, C., Moreira C., Spinoza, H. & Yonamine, M. Neurobehavioral, reflexological and physical development of Wistar rat offspring exposed to ayahuasca during pregnancy and lactation. *Rev bras farmacogn.* 21, 1065-1076 (2011).
- 63) Ramos, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests?. *Trends in Pharmacological Sciences* 29, 493-498 (2008).
- 64) Terçariol, P. & Godinho, A. Behavioral effects of acute exposure to the insecticide fipronil. *Pestic Biochem Physiol.* 99, 221-225 (2011).
- 65) Durcan, M. & Lister, R. Does directed exploration influence locomotor activity in a holeboard test. *Behav Neural Biol.* 51, 121-125 (1989).
- 66) Szegedi, V. et al. Transient alterations in neuronal and behavioral activity following bensultap and fipronil treatment in rats. *Toxicology* 214, 67-76 (2005).
- 67) Samson, A. et al. MouseMove: an open source program for semi-automated analysis of movement and cognitive testing in rodents. *Scientific Reports* 5, (2015).
- 68) Archer, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav.* 21, 205-235 (1973).
- 69) Carobrez, A. & Bertoglio, L. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 29, 1193-1205 (2005).
- 70) Pellow, S., Chopin, P., File, S. & Briley, M. Validation of open - closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth* 14, 149-167 (1985).
- 71) Calabrese, E. An assessment of anxiolytic drug screening tests: hormetic dose responses predominate. *Crit Rev Toxicol.* 38, 489-542 (2008).
- 72) Wolf, A. & Frye, C. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2, 322-328 (2007).
- 73) Bilkei-Gorzó, A. & Gyertyán I. Some doubts about the basic concept of hole-board test. *Neurobiology* 4, 405-415 (1996).
- 74) Takeda, H., Tsuji, M. & Matsumiya, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology* 350, 21-29 (1998).
- 75) Hill, T. & Lewicki, P. *STATISTICS Methods and Applications.* TatSoft.com (2018) at <http://www.statsoft.com/textbook/>
- 76) Cruz, A., Frei, F. & Graeff F. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49, 171-176 (1994).
- 77) Beltrand J, Nicolescu R, Kaguelidou F, et al. Catch-up growth following fetal growth restriction promotes rapid restoration of fat mass but without metabolic consequences at one year of age. *PLoS One.* ;4(4):e3343.(2009).
- 78) Maniam, J. & Morris, M. J. The link between stress and feeding behaviour, *Neuropharmacology*, vol. 63, no. 1, pp. 97- 110, (2012).
- 79) Jaime, J.H.P., Venus, B.C., Graciela, J.R., Tania HH, Lucia MM. Young-Adult Male Rats' Vulnerability to Chronic Mild Stress Is Reflected by Anxious-Like instead of Depressive-Like Behaviors. *Neurosci J.* 2016;2016:5317242. (2016).
- 80) Jensh, R., Brent, R. & Vogel, W. Studies concerning the effects of low-level prenatal X-irradiation on postnatal growth and adult behavior in the wistar rat. *Int J Radiat Biol* 50, 1069-1081 (1986).
- 81) Jensh, R., Brent, R. & Vogel, W. Studies of the effect of 0.4 and 0.6 Gy prenatal X-irradiation on postnatal and adult behavior in the wistar rat. *Teratology* 35, 53-61 (1987).
- 82) Minamisawa, T. & Hirokaga, K. Long-term effects of prenatal exposure to low levels of gamma rays on open-field activity in male mice. *Radiat Res* 144, 237-240, (1995).
- 83) File, S. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res.* 125, 151-157 (2001).
- 84) Adzu, B., Amos, S., Wambebe, C. & Gamaniel K. Effect of zizypus spinchristi wild aqueous extract on the central nervous system in mice. *J Ethnopharmacol.* 79, 13-16 (2002).
- 85) Baskar, R. & Devi, P. Influence of gestational age to low-level gamma irradiation on postnatal behavior in mice. *Neurotoxicol Teratol.* 22, 593-602 (2000).
- 86) Werboff, J., Havlena, J. & Sikov, W. Effects of prenatal X-irradiation on activity, emotionality, and maze learning ability in the rat. *Radiat Res.* 16, 441-452 (1962).
- 87) Wang, B. & Zhou, X. Effects of prenatal exposure to low-dose beta radiation from tritiated water on the neurobehavior of mice. *J Radiat Res.* 36, 103-111 (1995).
- 88) Craig, K., Brown, K. & Baum, A. Environmental factors in the etiology of anxiety. *Psychopharmacology* 1325-1339 (1995).
- 89) Kwon, E. & Kim, Y. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. *Obstetrics & Gynecology Science* 60, 506-519 (2017).
- 90) Merrifield, Matt and Olga Kovalchuk. "Epigenetics in radiation biology: a new research frontier" *Frontiers in genetics* vol. 4 40 doi:10.3389/fgene.2013.00040 (2013).