

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS 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

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 Rosângela, 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. MATERIAIS E MÉTODOS.....	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. RESULTADOS.....	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. DISCUSSÃO.....	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. CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS.....	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 ninhinhos 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, ninhinhos 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, em água.	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 ($> 100\text{mGy}$) em humanos durante exposição pré-natal têm sido amplamente investigados ³, estudos relatando os efeitos biológicos para baixas doses de radiação ionizante ($\leq 100\text{ mGy}$ 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, reprodutíveis 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.

2. Fundamentos Teóricos

Atualmente a radiologia médica é uma área bem estabelecida, importante e difundida mundialmente. Os exames diagnósticos que utilizam radiações ionizantes estão cada vez mais presentes em diversas práticas médicas, e o desenvolvimento tecnológico aliado a melhor compreensão da prática permite que as imagens tenham cada vez melhor qualidade com o uso de menores doses.

2.1 Aspectos históricos das Radiações Ionizantes

Ao serem descobertos os raios X no fim de 1895 pelo físico Wilhelm Conrad Roentgen, através de um tubo de Crookes modificado, houve uma euforia mundial e um esforço de confecção de aparelhos por todo o mundo. Curiosamente, Roentgen ao apresentar seu trabalho em um congresso na França no ano seguinte, apresentado na

Figura 1, levou Henry Becquerel a descobrir também a radioatividade de elementos químicos ¹⁹.

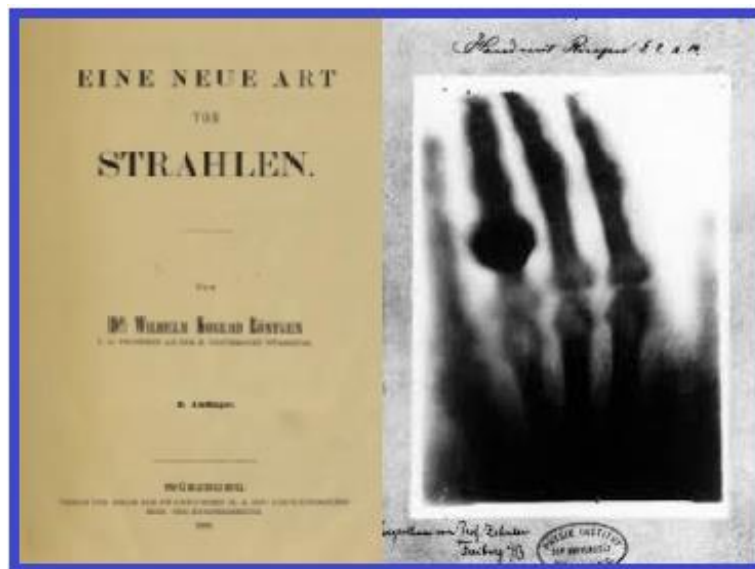


Figura 1: Capa do artigo publicado por Roentgen no “Tratado da sociedade de Física Médica para Wuzburg – Um novo tipo de raios” em 1896 e o registro da primeira radiografia, obtida em 22/12/1895, da mão esquerda de Anna Bertha Roentgen.

Inicialmente, a aplicação técnica das radiações ionizantes era precária e muitos dos conceitos físicos da produção dos raios X eram desconhecidos; por exemplo, ainda não se conhecia os elétrons, prótons e nêutrons. Os efeitos deletérios inerentes do uso das radiações ionizantes também eram desconhecidos e a facilidade tecnológica necessária para a confecção dos tubos de raios X permitiu que em um curto espaço de tempo o equipamento que “permitia olhar o corpo humano sem abri-lo” fosse difundido mundialmente.

No final do século XIX não havia tratamento efetivo para as doenças prevalentes, métodos precários e pouco eficientes geravam angústia nos médicos e familiares. O uso da radiação ionizante para fins tanto diagnósticos quanto terapêuticos levou a uma perspectiva esperançosa; tentou-se tratar tuberculose, melanomas, gripe entre outras doenças. A penicilina ainda não havia sido descoberta por Alexander Fleming, fato que ocorreria somente em 1928, sendo disponibilizada para a população em 1941, portanto, o risco de morte por infecção cirúrgica era prevalente ²⁰.

As primeiras décadas de uso mostraram os efeitos deletérios do uso desenfreado das radiações ionizantes. Esses efeitos foram amplificados pela precariedade dos

aparelhos, pela falta de proteção e pelo total desconhecimento das doses que estavam sendo ministradas. O controle do tempo, por exemplo, era realizado pelo próprio operador, já que as válvulas (1920) e os transistores (1950) ainda não tinham sido inventados. Uma coisa era o domínio da tecnologia da confecção de tubos de vácuo para a produção de raios X, outra era a utilização desta tecnologia para a exposição deliberada de seres humanos à radiação. Além dos pacientes, radiologistas e fabricantes de aparelhos, também sofriam exposições exageradas e danosas ²¹. Com o desenvolvimento da área foram criados órgãos para investigação desses efeitos, limites de dose e também houve a evolução tecnológica que levou ao desenvolvimento de equipamentos cada vez mais específicos para cada tipo de exame permitindo uma menor exposição.

2.2 Radiação Ionizante

A radiação ionizante recebe essa nomenclatura, pois é capaz de ionizar o meio em que interage, promovendo a ejeção de elétrons e produzindo íons. Podem ser classificadas em corpusculares e eletromagnéticas, a energia da radiação é diretamente proporcional à sua capacidade de penetração na profundidade dos tecidos ²².

As radiações ionizantes eletromagnéticas, como os raios X, possuem diferentes comprimentos de onda e a velocidade da luz. Quanto menor o comprimento de onda, maior sua frequência e energia, tendo conseqüentemente maior capacidade de penetração na profundidade dos tecidos. São consideradas indiretamente ionizantes porque a maior parte das alterações químicas e biológicas ocorrem após a absorção da energia liberada no meio, produzindo alterações ²³.

As radiações ionizantes podem ser oriundas de fenômenos naturais ou de fenômenos artificiais. O interesse nesse trabalho é a energia na faixa de radiodiagnóstico, utilizada para produção de imagens radiológicas. A tabela 1 apresenta como são classificados os equipamentos emissores de raios X conforme a diferença de potencial (DDP) entre o cátodo e o ânodo no tubo ²³.

Tabela 1: Classificação dos feixes de raios X em termos de tensão de aceleração dos elétrons que os produzem.

Baixa energia ou raio X mole	0,1-20 kV
Diagnóstico	20 - 120 kV
Ortovoltagem	120 - 300 kV
Energia Intermediária	300 - 1000 kV
Megavoltagem	> 1 MV

2.2.1 Equipamentos Emissores de Raios X

Os aparelhos emissores de radiação ionizante utilizados no radiodiagnóstico médico também são chamados de “equipamentos de quilovoltagem” porque demandam para seu funcionamento a energia na ordem de quilovolt (kV). Para tanto, esses equipamentos possuem componentes que retificam e transformam a energia da rede elétrica^{22, 24}. São compostos, também, pela mesa de exames, colimador - responsável pelo alinhamento e posicionamento da estrutura anatômica com o receptor de imagem -, comando do equipamento – componente que permite a seleção dos parâmetros físicos tempo de exposição [milissegundos (ms)], corrente elétrica [miliampères (mA)] e tensão nominal [quilovolts (kV)] - e o tubo de raios X^{24, 25}.

A alta DDP aplicada entre o ânodo e o cátodo do tubo aquecem o filamento (cátodo) e ocorre a emissão termiônica dos elétrons em direção ao ânodo (ou alvo), criando uma corrente elétrica. Durante o tempo de aplicação de carga ao tubo ocorrem diversas interações que transformam a energia cinética dos elétrons em calor e produção de fótons de raios X. Através de dois processos fundamentais há a produção dos raios X: a transição eletrônica (radiação característica) e a radiação de freamento (*Bremsstrahlung*)^{25, 26}.

2.2.2 Radiação Natural

A radiação ionizante conhecida como radiação natural ou “de fundo” (em inglês *background*) está presente no meio ambiente e nos organismos. Os componentes da radiação natural podem ser de procedência cósmica, da crosta terrestre, provenientes da água, provenientes do ar e radiação dos componentes internos do organismo ²³. A contribuição no valor de dose varia com o local e hábitos de cada ser humano.

A radiação cósmica primária é originada no espaço distante, consistindo principalmente de fótons e algumas partículas α , dentre outras; a interação dessas radiações com a atmosfera terrestre acaba por produzir uma radiação secundária e a intensidade dos raios cósmicos varia diretamente com a elevação do nível do mar e é inversamente proporcional a latitude geomagnética ²⁷.

A crosta terrestre emite radiação natural devido à presença de elementos químicos naturalmente radioativos (isótopos radioativos), a maior contribuição vem das séries do Urânio e do Tório, podendo-se, no entanto, constatar uma pequena parcela oriunda do C^{14} e K^{40} ²⁷.

A radioatividade natural existente no ar é devida à presença dos gases Radônio e Tório. Esses gases fazem parte das cadeias radioativas do Urânio e do Tório, sendo então formados na crosta terrestre e difundidos posteriormente para a atmosfera. Os produtos de decaimento destes elementos são sólidos, portanto, permanecem na atmosfera por deposição nas partículas de poeira existentes. No Brasil, os materiais empregados para a construção são normalmente ricos em Tório (por exemplo: pedras, alvenaria, cimento) por isso é comum que a atividade do ar cresça gradativamente sempre que as condições de ventilação dos ambientes se tornem precárias ²⁷.

Universalmente a água apresenta radioatividade, as águas de chuva adquirem radioatividade do ar e as águas subterrâneas e superficiais podem adquiri-las das substâncias presentes nas rochas e no solo. O radônio é o maior constituinte entre os materiais radioativos da água e sua contribuição na dose é devida ao alto teor de composição dos seres vivos, que podem incorporá-lo.

O corpo humano apresenta pequena quantidade de material radioativo, devido principalmente aos elementos radioativos presentes nos vegetais e materiais minerais com

que a pessoa se alimenta e se hidrata. Os isótopos mais importantes para essa contribuição são o K^{40} , C^{14} e Ra^{226} ²⁷.

Todo organismo além de estar exposto às radiações ionizantes contem em sua composição materiais radiativos.

2.2.3 Exposição do ser humano

O ser humano tem sido cada vez mais exposto às baixas doses. De acordo com o Report número 160 do *National Council on Radiation Protection and Measurements* (NCRP) do ano de 2009, no ano de 2006 a população dos Estados Unidos foi exposta a um valor de dose anual proveniente de procedimentos médicos mais de sete vezes maior que a população do mesmo país em 1980 ²⁸. Também, nesse documento, estima-se que metade do total da dose anual de exposição à radiação de todas as fontes provêm de exposições médicas, conforme apresentado na Figura 2.

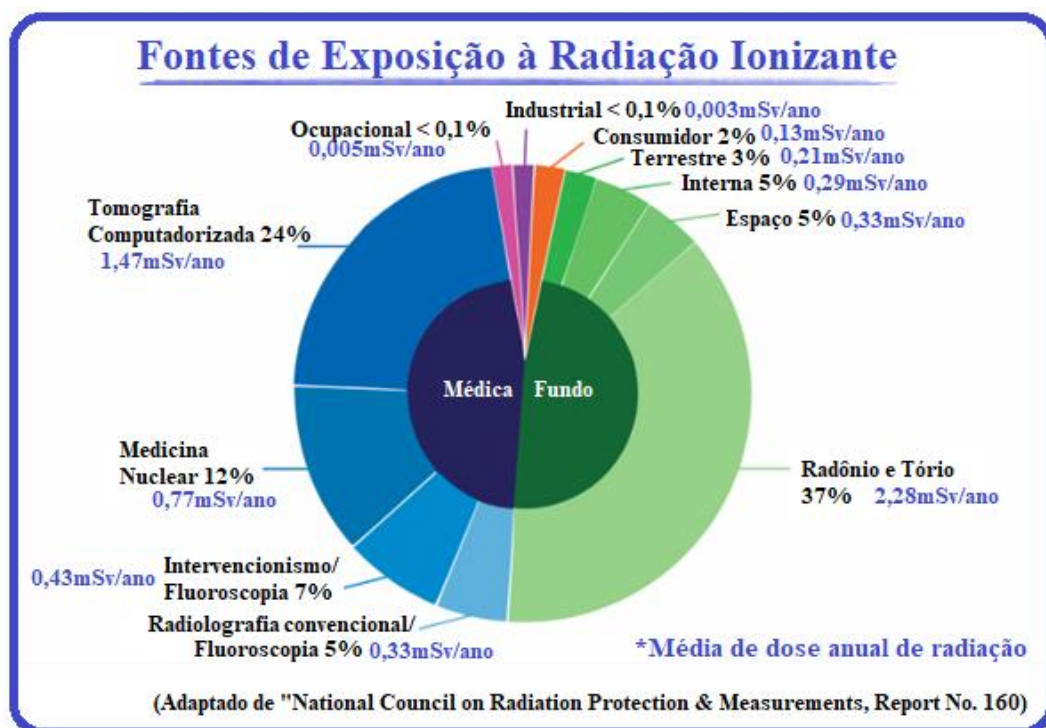


Figura 2: Gráfico adaptado da distribuição de doses a que o ser humano está exposto.

Consequentemente, as exposições médicas, mesmo apresentando baixos valores de exposição, tem grande importância para a dose efetiva coletiva. O aumento da dose

coletiva incita a compreensão de níveis seguros de exposição em toda população, especialmente para as gestantes.

2.3 Grandezas Físicas das Radiações Ionizantes

O estabelecimento das grandezas físicas das radiações ionizantes aconteceu inicialmente devido à preocupação com os efeitos biológicos e proteção radiológica; a quantificação era necessária para se relacionar a dose (termo oriundo da farmacologia) com os efeitos causados. Cada grandeza está associada a uma ou mais unidades.

2.3.1 Exposição (X)

A exposição (X) foi a primeira grandeza a ser definida e é utilizada para radioproteção, serve para quantificar as ionizações produzidas por radiação X ou γ no ar. É definida como o quociente de dQ por dm ^{22, 26}.

$$X = \frac{dQ}{dm} \quad (1)$$

onde dQ é o valor absoluto da carga total de íons de um mesmo sinal produzidos no ar quando todos os elétrons produzidos pelos fótons numa determinada massa de ar dm são completamente freados no ar. No Sistema Internacional (SI) a unidade da exposição é o Coulomb por quilograma (C/kg).

2.3.2 Dose Absorvida (D)

Dose Absorvida (D) é definida como a quantidade de energia depositada pela radiação ionizante em um volume conhecido de determinado elemento de massa. É válida para quase todos os tipos de radiação ionizante (X, γ , α , β) e para qualquer tipo de material absorvedor, suprimindo as limitações da grandeza exposição^{22, 26}. É definida como o quociente de dE por dm :

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (2)$$

onde dE é a energia média depositada pela radiação ionizante num material de massa dm no volume. No Sistema Internacional (SI) a unidade da dose absorvida é o Gray (Gy), sendo a dose definida em joule por quilograma.

É possível relacionar a dose absorvida (D) com a exposição (X) aplicando-se um fator de conversão ($f\lambda$), cujo valor depende da energia da radiação utilizada e do material irradiado ^{22, 26}:

$$D = X \cdot f\lambda \quad (3)$$

2.3.3 Kerma (K)

Em situações em que não é possível medir a Dose Absorvida mede-se a grandeza Kerma, do inglês “*Kinetic Energy Released per unit Mass*”, sendo a energia cinética liberada na matéria por unidade de massa.

Essa grandeza somente é válida para radiação ionizante indiretamente ionizante (raios X, raios γ e nêutrons), é o quociente da soma das energias cinéticas de todas as partículas ionizantes carregadas liberadas por partículas não carregadas (dE_{TR}) pela massa (dm) de um material ^{22, 29}. O cálculo pode ser realizado pela equação 6:

$$K = \frac{dE_{TR}}{dm} \quad (4)$$

O Kerma está definido no SI em J/kg (1 J/kg = 1 Gy). Em situações onde a radiação de freamento (“*bremsstrahlung*”) é desprezível e há o equilíbrio eletrônico o Kerma será igual à Dose Absorvida (D) no ar, em situação inversa o Kerma no ar pode ser relacionado à Exposição (X) através da seguinte equação:

$$K_{ar} = \frac{X(\overline{W_{ar}})}{(1-g)} \quad (5)$$

onde $\overline{W_{ar}}$ é a energia média necessária para produzir um par de íons no ar (33,97 eletrons Volt por par de íons com incerteza de 0,15%), e é a carga eletrônica e g é a fração de energia do elétron perdida por *bremsstrahlung*.

2.3.4 Dose Equivalente (H)

A grandeza Dose Equivalente (H) foi definida para proteção radiológica, já que permite avaliar o dano biológico causado pela radiação ionizante. H considera o poder de dano para cada tipo de radiação e é definida como a dose absorvida média por um tecido ou órgão ponderada pela qualidade da radiação^{22,26}. A dose equivalente H é calculada pela seguinte expressão:

$$H = D \cdot Q \quad (6)$$

onde D é a dose absorvida e Q é um fator de qualidade da radiação (adimensional e constitui um fator de peso da Eficácia Biológica Relativa, dependente do tipo de radiação ionizante).

Também, para o cálculo de dose equivalente em tecidos e órgãos (H_T) é possível utilizar a expressão:

$$H_T = \sum_R W_R \cdot D_{TR} \quad (7)$$

onde D_{TR} é a dose absorvida no tecido ou órgão e W_R é o fator de peso da radiação.

A dose equivalente é aplicada somente para valores de até 1 Sievert, valor correspondente a ocorrência de reações teciduais. Quando se trata de valores de dose para a região correspondente a efeitos determinísticos a dose é avaliada em Gray, uma vez que o fator de qualidade da radiação não pode ser usado para avaliar os efeitos de exposições acidentais com altos valores de dose nem para experimentos de Radiobiologia.

2.3.5 Dose Efetiva (E)

A radioproteção também utiliza a grandeza Dose Efetiva (E) para estabelecimento de limites de exposição do corpo todo^{22,26}. Através da seguinte expressão é calculada:

$$E = \sum_T W_T \cdot H_T \quad (8)$$

onde H_T é a soma das doses equivalentes nos tecidos multiplicada pelo fator de ponderação do tecido ou órgão W_T . O fator W_T é relacionado a radiosensibilidade de um dado tecido ou órgão no que está relacionado à probabilidade de indução de câncer e efeitos hereditários. Os valores são constantemente atualizados e são apresentados por

guias de recomendações internacionais, sendo baseados em pesquisas sobre radiobiologia. Grande parte dos valores atuais foram obtidos do estudo epidemiológico dos sobreviventes de Hiroshima e Nagasaki ^{22, 26}.

2.3.6 Equivalente de Dose

A grandeza operacional definida para monitoração é o Equivalente de Dose. Existem dois tipos dessa grandeza: equivalente de dose pessoal ($H_p(d)$) e equivalente de dose ambiente ($H^*(d)$). O cálculo dessas grandezas depende dos fatores de qualidade da radiação (Q) como ponderação; esses fatores são dados em função da transferência linear de energia.

O equivalente de dose pessoal, $H_p(d)$, é utilizado para monitoração individual, sendo equivalente ao produto da dose absorvida em um ponto (tecido mole), na profundidade d do corpo, pelo fator Q nesse ponto. No SI é utilizada a unidade Sievert (Sv) e o valor de dose apresentado fornece uma estimativa da dose efetiva; o monitoramento mensal de IOEs através da dose acumulada é apresentado em $H_p(d)$ ^{22, 26}.

O equivalente de dose ambiente, $H^*(d)$, é utilizado para monitoração de ambientes onde há exposição. Obtém-se o valor do $H^*(d)$ através da multiplicação da dose absorvida em um ponto pelo fator de qualidade Q , sendo equivalente ao efeito produzido em uma esfera de tecido equivalente de 30 cm de diâmetro (definida pela *International Commission on Radiation Units and Measurements - ICRU*) e profundidade d .

2.4 Detectores de Radiação Ionizante

Existem diversos modelos de detectores de radiações ionizantes com propriedades específicas que permitem a detecção e quantificação dos distintos tipos de radiações ionizantes. A câmara de ionização (C.I.) é um dos detectores de radiação ionizante existentes, sendo o principal instrumento para detecção e mensuração de raios X devido sua alta sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade.

2.4.1 Câmara de Ionização

As C.I. desenvolvidas por Attix em 1930 e aperfeiçoadas por Sievert são acopladas ao eletrômetro - dispositivo eletrônico que apresenta um *display* e fornece energia às C.I.s³⁰. A C.I. é constituída por um volume sensível que contém dois eletrodos [parede (catodo) e coletor central (ânodo)] e está preenchido por um gás, que pode ser o ar ambiente^{22, 31}. Quando há ionização desse gás os íons são coletados e, com a aplicação de um campo elétrico entre os eletrodos, são coletadas as cargas elétricas, sendo a intensidade da radiação ionizante proporcional ao fluxo de íons no volume sensível^{22, 31}. A geometria da C.I. é variável, a espessura da parede e o gás são decisivos na resposta de cada instrumento.

Quando se utiliza instrumentos com ar ambiente no volume sensível é necessário fazer a correção para a temperatura e pressão, através da equação²⁸:

$$K_{TP} = \frac{P_0 (273,15+T)}{P (273,15+T_0)} \quad (8)$$

onde P_0 e T_0 são, respectivamente, os valores de pressão atmosférica e de temperatura de referência utilizados em Laboratórios Padrão autorizados pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) para garantia de qualidade em suas medições¹⁹, e P e T são os valores de pressão atmosférica e de temperatura obtidos durante as medições.

A C.I., sendo um equipamento de precisão, demanda uma calibração bianual.

2.5 Interação da Radiação com a matéria

A radiação ionizante ao interagir com um material pode provocar além da ionização a excitação atômica e a ativação do núcleo. No processo de ionização quando há quebras de ligações químicas os elétrons retirados do orbital, livres e com alta energia, podem ser nomeados radicais livres. A excitação atômica é caracterizada pela mudança de órbita dos elétrons, que ao regressarem emitem luz ou radiação característica. A ativação do núcleo ocorre quando a radiação que interage tem energia superior à energia nuclear de ligação.

Há, portanto, níveis de ionização que levam a probabilidade de interação da radiação com a matéria, esses níveis dependem da seção de choque da radiação em relação

ao material utilizado. A transferência de energia das radiações que tem carga se dá principalmente pelo campo elétrico e são denominadas de radiações diretamente ionizantes. Por outro lado, radiações que não tem carga, como os fótons, depositam sua energia de maneira dispersa e interagem individualmente transferindo suas energias para os elétrons, que levam a novos processos de ionização, sendo intituladas de radiação indiretamente ionizante ^{22, 32 - 34}.

As ondas eletromagnéticas ionizantes, como os raios X, podem desencadear uma ionização primária na qual o elétron, depois da interação na trajetória inicial, é ejetado do átomo através de diferentes processos. Esse elétron ejetado pode ter a energia igual à do fóton incidente levando à novas ionizações, que são chamadas de ionizações secundárias. A probabilidade de ionizações secundárias ocorrer é maior do que a de primárias, portanto, a maior ocorrência em ionizações através de raios X é a produção de radicais livres.

Os principais modos de interação dos fótons de raios X são o efeito fotoelétrico, o efeito Compton e a produção de pares. A energia do fóton incidente e a composição química do meio determinam a ocorrência desses processos.

2.5.1 Efeito Fotoelétrico

O efeito fotoelétrico é descrito como a transferência total da energia dos raios X ou γ a um elétron orbital das camadas internas e com maior energia de ligação do átomo (camadas K, L e M) levando a ejeção desse elétron. Há então a produção de um íon excitado que ao ter o espaço vago preenchido por um elétron de uma camada mais externa retorna a seu estado fundamental, essa perda de potencial de energia é balanceada pela emissão de um fóton característico ^{22, 33, 34}, conforme apresentado na Figura 3.

Esse efeito é predominante para baixas energias e para elementos químicos de elevado número atômico ^{29, 34}. Nos tecidos moles essa radiação característica é de baixa energia, cerca de 5,0 kV e com mínima repercussão biológica. O efeito fotoelétrico ocorre em baixas energias, depende do número de prótons e é importante especialmente para a radiologia diagnóstica ²³.

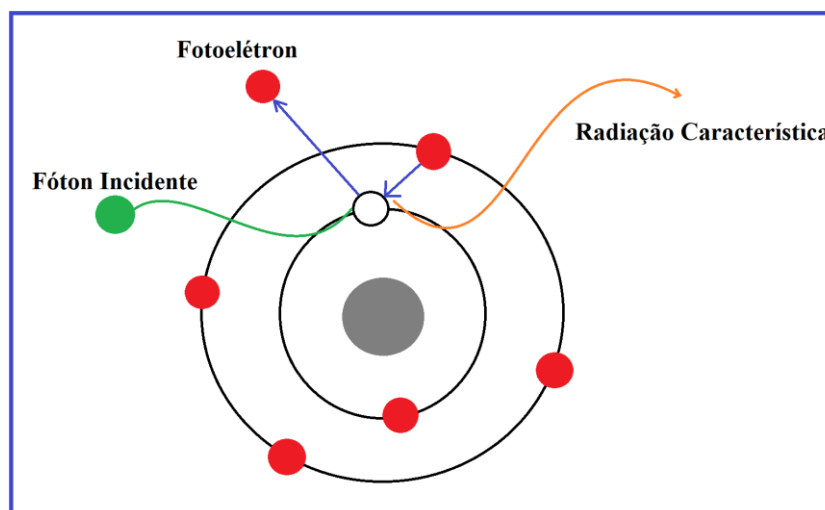


Figura 3: Representação do Efeito Fotoelétrico.

2.5.2 Efeito Compton

No efeito Compton o fóton interage com um elétron de baixa energia de ligação - camada mais externa-, que recebe apenas parte da energia, desviando sua trajetória, conforme ilustrado na Figura 4. Um fóton de baixa energia pode gerar elétrons com energia variável, de zero a um valor máximo, porque a transferência de energia se dá de maneira aleatória, variando com a direção do elétron. A energia cinética do elétron espalhado depende do ângulo de espalhamento e como o fóton não é absorvido pode continuar interagindo com outros elétrons. O efeito Compton tem maior probabilidade de ocorrer quando aumenta o valor da energia da radiação ionizante incidente ou quando a energia de ligação do elétron que recebe a energia é menor (camadas de valência mais externas) ^{25, 32, 34}.

O efeito Compton é predominante para energias acima de 40 keV no ar, e a probabilidade de ocorrência depende do número de elétrons disponíveis no material ^{22, 34}. Esse efeito é importante para a radiologia diagnóstica e independe do número atômico do meio absorvedor. Independente do processo de absorção, se fotoelétrico ou Compton, a energia dos fótons é convertida em energia cinética para os elétrons ²³.

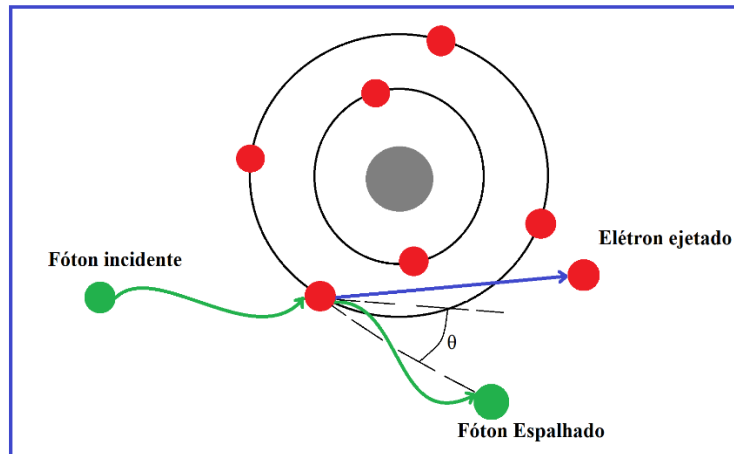


Figura 4: Representação do Efeito Compton.

2.5.3 Produção de Pares

A produção de pares elétron-pósitron ocorre quando fótons com a energia superior a duas vezes a massa de repouso do elétron (1,022 MeV) passam próximos de núcleos de átomos de elementos com elevado número atômico. Toda a energia do fóton é transferida para um par de partícula [elétron (β^-)] e anti-partícula [pósitron (β^+)], como ilustrado na Figura 5.

O par de partículas formado transfere sua energia cinética para o meio; o pósitron pode se aniquilar com um elétron livre dando origem a dois fótons (em sentidos opostos com energia de 511 keV) e o elétron voltará para uma camada de valência ^{22, 31, 34}.

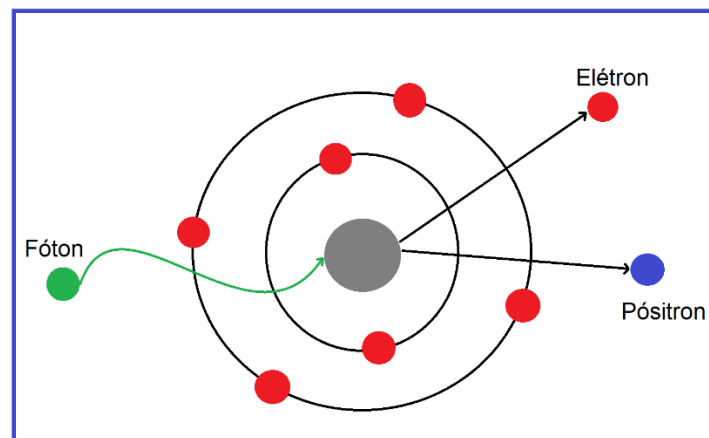


Figura 5: Representação da Produção de Pares.

Os três mecanismos descritos anteriormente estão relacionados à energia dos fótons incidentes e ao Z do material absorvedor na Figura 6.

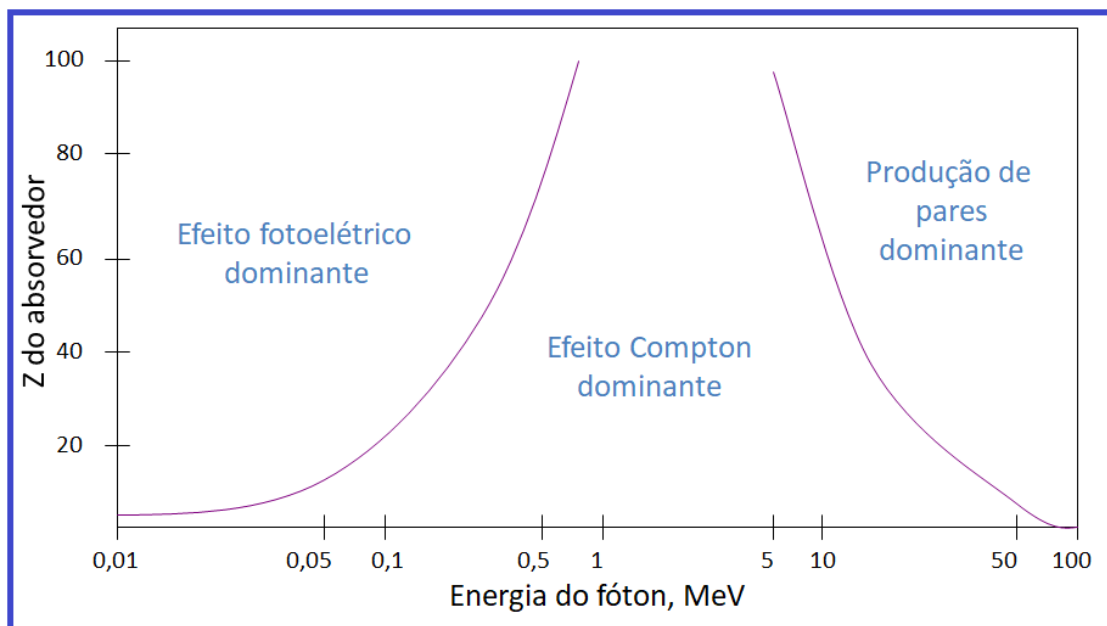


Figura 6: Gráfico da prevalência dos processos de absorção dos fótons de raios X com a matéria em função da energia do fóton em MeV e do número atômico Z do material absorvedor.

2.5.4 Efeito Rayleigh

O efeito Rayleigh ou espalhamento Compton coerente ocorre com a interação de um fóton incidente de baixa energia com elétrons que possuem alta energia de ligação. Nessa interação o átomo todo pode absorver o recuo e o fóton não perde energia, apenas é reemitido em uma direção diferente – conservação de momento ^{30, 34}.

2.5.5 Transferência Linear de Energia

A transferência linear de energia, do inglês *Linear Energy Transfer* (LET), é definida como a quantidade de energia depositada ou transferida pela radiação ionizante por unidade de comprimento do trajeto percorrido em um material absorvedor (KeV por micron de unidade de densidade do material), conforme apresentado na tabela 2. Considera-se que toda energia da radiação ionizante perdida por partículas carregadas em

processos de colisão é absorvida pelo meio, para fótons a LET refere-se aos elétrons liberados nos processos de interação com o material. Os efeitos biológicos produzidos pela radiação ionizante são dependentes da LET e estima-se que 2/3 dos efeitos causados por radiações de baixa LET, como os raios X, se dão por ação indireta: radiólise da água²².

Tabela 2: Valores de LET para alguns tipos de radiação e energia, em água.

Partícula	Energia (MeV)	keV.μm⁻¹
raios gama do Co-60	1,25	0,2
raios X produzidos com 250 kV	até 250 keV	2,0
Prótons	10	4,7
Prótons	150	0,5
alfa	2,5	166
íons de Fe	2.000	1.000

Fonte: Okuno, E., Yoshimura, E.M.. “Física das Radiações”. São Paulo: Oficina de Textos, 2010.

2.6 Efeitos Biológicos das Radiações Ionizantes

A radiobiologia estuda a ação das radiações ionizantes em organismos vivos. Os efeitos deletérios inerentes da radiação ionizante começaram a ser estudados e registrados concomitantemente com a aplicação dessa. Os efeitos imediatos e tardios em tecidos humanos passaram a ser evidentes²²; porém, devido à grande dificuldade em avaliar as respostas individuais e os fatores externos relativos ao meio, o que se sabe atualmente provém de estudos sucessivos de grupos humanos que foram expostos à doses relativamente elevadas de radiação, em decorrência de acidentes radiológicos, e de extrapolações de resultados experimentais: realizados com células *in vivo* e *in vitro*, com animais e métodos computacionais. O estudo epidemiológico sobre efeitos tardios da radiação ionizante mais importante do mundo, pela duração da pesquisa, tamanho da população atingida e dados registrados anualmente, desde 1950, foi o dos sobreviventes das bombas atômicas de Hiroshima e Nagasaki^{12, 13, 35}.

Os efeitos biológicos das radiações ionizantes em células, tecidos e organismos podem ser classificados quanto ao seu mecanismo, se direto ou indireto, e quanto à sua natureza, se reações teciduais ou efeitos estocásticos ^{22, 23}.

O mecanismo direto se dá quando a radiação ionizante age diretamente em macromoléculas importantes da célula com efeitos biológicos observáveis; como quando há interação com o ácido desoxirribonucleico (DNA). O DNA contém informações genéticas da célula e é uma molécula grande que possui uma estrutura de dupla hélice em espiral, composta por dois filamentos com séries de nucleotídeos. Os nucleotídeos possuem uma base nitrogenada ligada à uma molécula de açúcar (pentose) e a um grupo fosfato. As cinco bases nitrogenadas são adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) e Uracila [(U) presente apenas na constituição do RNA]. Essas bases (ACTG no DNA) se organizam em pares, ou fitas, unidas por pontes de hidrogênio, são classificadas em purinas (A e G) e pirimidinas (C e T). As ligações se dão entre A/T e C/G.

Os danos da radiação ionizante podem causar uma mudança de uma base, perda de uma base, quebra de pontes de hidrogênio, quebra de uma única fita, quebra das duas fitas, ligação cruzada dentro da hélice de uma molécula de DNA, entre duas moléculas de DNA ou entre uma molécula de DNA e uma proteína. A ruptura das pontes de hidrogênio é reconstituída corretamente em dezenas de minutos, por enzimas, porém, os danos irreversíveis aparecem quando há um número alto de danos simultaneamente, ou quando uma das pontas da fita ficar em estado reativo, podendo ocorrer a peroxidação. Os mecanismos de reparo de danos causados pela radiação podem reparar o dano, entretanto, quando não há o reparo podem ocorrer aberrações cromossômicas ^{22, 23, 34}. Através da estimativa de aberrações cromossômicas é possível realizar a dosimetria de pessoas irradiadas, uma vez que para a dose absorvida de 1 a 2 Gy de raios X produz cerca de 500 a 1.000 quebras de uma única fita, 1.000 a 2.000 alterações de bases e 40 quebras de duas fitas em uma única célula de mamífero ²³. A fundação japonesa *Radiation Effects Research Foundation* (RERF), utiliza esse método de dosimetria biológica para avaliação de dose individual estimada de toda população atingida pelas bombas nucleares de Hiroshima e Nagasaki, trabalho realizado desde 1960 ³⁶. Acredita-se que o erro no reparo celular, principalmente pela quebra de duas fitas da molécula de DNA, seja a principal causa de morte celular e indução de efeitos mutagênicos e cancerígenos ²².

O mecanismo indireto ocorre quando os fótons interagem com as moléculas de água do organismo. A água é a molécula predominante nos organismos vivos e compõe

em média 80% da massa. Portanto, a energia depositada na água é de grande importância para os danos biológicos quando se trata de baixas energias. Essa interação leva a excitação e ionização das moléculas de água, possivelmente levando a uma quebra (radiólise), que desencadeia a produção de componentes reativos: elétron aquoso, átomo de hidrogênio e radical hidroxila. Esses componentes são capazes de se difundir e danificar alvos críticos. Os radicais livres, quando em excesso, reagem ou oxidam com outras moléculas gerando reações em cadeia. Para os fótons de raios X estima-se que 70% dos efeitos biológicos são causados pelo mecanismo indireto. Radiações ionizantes com alta LET produzem uma grande quantidade de radicais livres em uma pequena área, a proximidade pode levar à recombinação, e essa produz peróxido de hidrogênio, que é altamente oxidante ^{22, 34}.

Dados de efeitos causados pelas radiações ionizantes são analisados e coletados por dois comitês: *Biological Effects of Ionizing Radiation* (BEIR) e *United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation* (UNSCEAR). Esses dois comitês publicam periodicamente estimativas de riscos para radiações induzirem câncer e efeitos hereditários. Também, o ICRP é responsável por desenvolver guias de recomendação e desenvolvimento no campo da proteção radiológica ³⁴.

2.6.1 Natureza dos efeitos biológicos

Os efeitos biológicos das radiações ionizantes podem ocorrer tanto no indivíduo (efeitos somáticos) quanto nos seus descendentes (efeitos hereditários). Os efeitos somáticos são classificados como reações teciduais (ou efeitos determinísticos) e efeitos estocásticos, enquanto todos os efeitos hereditários (ou genéticos) são de origem estocástica ³⁴.

As reações teciduais são efeitos que resultam de um alto grau de morte ou dano celular causado pela radiação, quando esse grau não é compensado pela reposição ou reparo celular podem haver prejuízos detectáveis no funcionamento do tecido ou órgão. Para esse limiar de dose a severidade dos efeitos necessariamente aumenta com o aumento da dose ³⁴. O *Report da International Commission on Radiological Protection* (Comissão Internacional de Proteção Radiológica – ICRP) de número 103 (2007), estipula que para radiações de baixa LET, como os raios X, o valor de dose para surgimento de reações

teciduais estaria entre 0,15 e 0,5 Gy, variando o tecido exposto ³⁷. As reações teciduais podem ocorrer algumas horas ou dias após a exposição, como as lesões de pele (eritema), por exemplo, ou também anos após o evento. Estudos epidemiológicos dos sobreviventes das bombas atômicas no Japão mostram evidências de que há efeitos tardios que resultam de danos nos tecidos: como doenças vasculares cardíacas e cerebrais, além da opacificação do cristalino (catarata) ³³.

Os efeitos estocásticos são probabilísticos que surgem de alterações em células normais, a probabilidade de ocorrência, mas não sua severidade, aumenta com a dose. Esses efeitos não apresentam limiares de dose e as recomendações de proteção radiológica consideram que qualquer valor de dose pode induzir o efeito, inclusive as doses provindas da radiação natural e doses abaixo dos limites estabelecidos por normas e recomendações. A maior preocupação com os efeitos estocásticos para energia do diagnóstico está no desenvolvimento de câncer e efeitos hereditários, que ocorrem nas células sexuais e podem ser repassadas aos descendentes ^{33, 34}.

2.6.2 Lei da Radiossensibilidade

A lei da radiossensibilidade, ou lei de Bergonie e Tribondeau, descreve que a sensibilidade de células vivas à radiação ionizante é diretamente proporcional à sua atividade proliferativa e inversamente proporcional ao seu grau de especialização ³⁸. Seguindo esses preceitos, o feto e o embrião são extremamente suscetíveis a apresentarem efeitos teratogênicos em decorrência da exposição intrauterina aos raios X. Os principais efeitos teratogênicos, nesse caso, são as malformações, alterações estruturais e de crescimento, o retardo mental, a indução de câncer e a morte.

2.6.3 Eficácia Biológica Relativa

Efeitos biológicos causados por doses iguais de diferentes tipos de radiação ionizante podem ser comparados através da Eficácia Biológica Relativa (EBR). A EBR é definida como a relação entre os diferentes tipos de radiação ionizante e a radiação padrão de referência – raios X de 250 keV e atualmente os raios γ de ⁶⁰Co. Portanto, através da

EBR pode-se estimar o valor de dose de um tipo diferente de radiação ionizante para produzir o mesmo efeito biológico que a radiação padrão. A EBR varia de acordo com o ciclo celular, dose utilizada, fracionamento da dose, taxa de dose e qualidade da radiação (LET). A EBR é menor para altas doses unicamente fracionadas que para baixas doses multiplamente fracionadas. A análise dos efeitos é dada por testes em sistemas biológicos e o ICRP descreve que a eficácia dos diferentes tipos de qualidade de radiação ionizante através de fatores de peso de radiação (W_R)^{23, 34}.

2.6.4 Estágios da ação

Os estágios da ação da interação das radiações ionizantes com o organismo humano são: físico, físico-químico, químico e biológico. Inicialmente há o estágio físico, no qual ocorre a ionização de um átomo em cerca de 10^{-15} s. O estágio físico para os radicais livres produzidos por mecanismo indireto demora mais tempo para ocorrer em relação ao mecanismo direto: cerca de 10^{-10} s. Em seguida, no estágio físico-químico ocorrem as quebras das ligações químicas das moléculas que sofreram ionização, com duração de 10^{-6} s. Então, o estágio químico acontece e os fragmentos da molécula se ligam a outras moléculas, com duração de poucos segundos. Finalmente ocorre o estágio biológico, que pode durar dias, semanas e até dezenas de anos para que apareçam os efeitos bioquímicos e fisiológicos com alterações morfológicas e funcionais dos órgãos^{22, 34}.

2.6.5 Ciclo celular

O ciclo celular é o conjunto de fases que uma célula realiza para duplicar o DNA, existem dois períodos: a mitose (M) e a síntese (S). Entre a mitose e a síntese existem fases no ciclo celular: G1 e G2; e para células altamente especializadas há também uma fase onde a célula permanece indefinidamente na intérfase (G0), conforme ilustrado na Figura 7. Células em processo de duplicação são mais radiosensíveis, a replicação do genoma ocorre na fase S e a mitose para células-filhas ocorre entre as fases G2/M. O tempo para geração de células costuma ser de 10 a 40 horas; a fase G1 gasta cerca 30%,

a fase S 50%, a fase G2 15% e a fase M 5% do tempo do ciclo celular. Existem pontos de verificação para garantir a qualidade dos processos entre as fases G1/S e G2/M ³⁴.

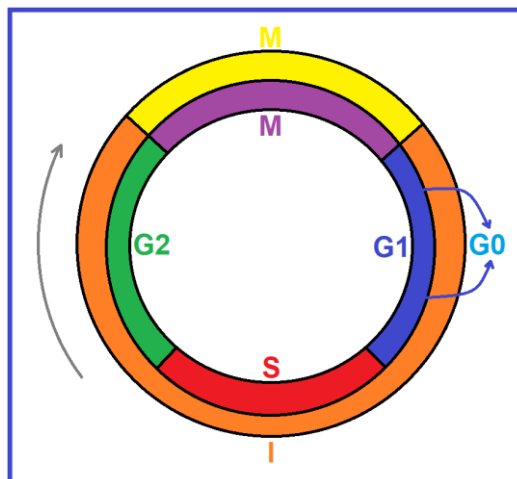


Figura 7: Representação das fases do ciclo celular.

A radiosensibilidade da célula difere para cada fase do ciclo celular, geralmente a fase mais resistente é no final da fase S, a mais sensível é G2/M e entre elas a fase G1. A fase de síntese é a menos sensível à radiação possivelmente devido à duplicidade do conteúdo informacional, que poderia tornar mais eficiente a atuação dos mecanismos de reparo, e devido à maior proporção de reparo celular. A transição de fases G2/M é muito sensível à radiação ionizante devido à compactação do DNA, que aumenta a probabilidade de interação e indução de aberrações cromossômicas, também de morte celular. A compactação da cromatina torna as lesões inacessíveis às enzimas reparadoras. Na transição G1/S ocorre a atividade máxima de enzimas importantes para o reparo das quebras duplas do DNA ^{23, 34}. As células em repouso, não envolvidas no ciclo celular, são ainda mais resistentes à radiação quando comparadas com as células da fase S ³⁴.

A irradiação de células retarda a progressão do ciclo celular e ativa os genes de reparo. Os mecanismos de reparo celular são fundamentais para recuperação das células à agentes prejudiciais, mecanismos enzimáticos detectam e reparam os danos das radiações ionizantes no DNA ^{23, 34}. Através de um processo de clivagem da cadeia polinucleotídica da fita de DNA danificada retira-se a região danificada e a DNA polimerase consegue, utilizando a fita oposta não danificada, preencher a lacuna extraída. O reparo das lesões em células de mamíferos ocorre em 1 hora e pode ser maior em tecido normal de resposta lenta *in vivo* ²³. Se o reparo não ocorrer, pode haver transformação celular com aparecimento de câncer ou apoptose celular.

2.7 Proteção Radiológica

A proteção radiológica, ou radioproteção, é definida pela Norma da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) NN 3.01, “Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica” de 2005 ³⁹, como o conjunto de medidas que visam a proteger o ser humano e seus descendentes contra possíveis efeitos indesejados causados pela radiação ionizante. Os requisitos que regem a proteção radiológica são: justificativa, otimização da prática e limite de dose.

2.7.1 Justificativa

O princípio da Justificativa estabelece que o uso de radiações ionizantes deve produzir benefícios para os indivíduos expostos ou para a sociedade. Esses benefícios devem ser suficientes para compensar o detrimento correspondente causado pela radiação ionizante, tendo-se em conta os fatores sociais e econômicos, assim como outros fatores pertinentes ³⁹. Requer, também, que para exposições médicas de pacientes deve haver justificativa, ponderando-se os benefícios diagnósticos ou terapêuticos que venham a produzir em relação ao detrimento correspondente, levando-se em conta os riscos e benefícios de técnicas alternativas disponíveis, que não envolvam os riscos da exposição a radiações ionizantes ³⁹.

2.7.2 Otimização da Prática

Todas as exposições a radiações ionizantes, excetuando-se as práticas de terapia médica, devem ser otimizadas de maneira que a magnitude das doses individuais, o número de pessoas expostas e a probabilidade de ocorrência de exposições seja tão baixa quanto razoavelmente exequível – princípio ALARA (do inglês, *As low as Reasonably Achievable*) ³⁹. O processo de otimização deve observar a restrição de dose por valores determinados tanto para indivíduos do público quanto indivíduos ocupacionalmente expostos.

2.7.3 Limite de Dose

A limitação de dose, estabelecida na norma CNEN-NN-3.01, restringe os limites de dose que indivíduos ocupacionalmente expostos (IOEs) e indivíduos do público podem ser expostos em decorrência de práticas autorizadas pela CNEN ³⁹. Esses limites primários anuais estabelecidos na norma são apresentados na tabela 3.

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.

DOSE EQUIVALENTE	IOE	Indivíduo do Público
Dose equivalente efetiva (corpo todo)	20 mSv ^(a)	1 mSv ^(b)
Dose equivalente para órgão ou tecido T	500 mSv	1 mSv / w_T
Dose equivalente para pele ^(c)	500 mSv	50 mSv
Dose equivalente para o cristalino	20 mSv	15 mSv
Dose equivalente para extremidades	500 mSv	----

(a) Média ponderada em 5 anos consecutivos, desde que não exceda 50 mSv em qualquer ano.

(b) Em circunstâncias especiais, a CNEN poderá autorizar um valor de *dose efetiva* de até 5 mSv em um ano, desde que a *dose efetiva* média em um período de 5 anos consecutivos, não exceda a 1 mSv por ano.

(c) Valor médio em 1 cm² de área, na região mais irradiada.

A Norma também determina que gestantes ocupacionalmente expostas devem ter suas tarefas controladas de maneira que seja improvável que, a partir da notificação da gravidez, o feto receba dose efetiva superior a 1 mSv durante o resto do período de gestação. Menores de 18 anos de idade não podem ser trabalhadores sujeitos à exposição ocupacional e estudantes ou estagiários menores de 18 anos não devem receber doses superiores aos limites primários estabelecidos para o público, nem devem ultrapassar 1/10 daqueles limites em uma única exposição ³⁹. No caso de acompanhantes e voluntários, que eventualmente assistem pacientes, as doses devem ser restritas de maneira que estes

não recebam mais de 5 mSv durante o período de diagnóstico ou tratamento do paciente
39.

É imprescindível para o emprego das técnicas que utilizam radiações ionizantes que todos os IOEs tenham conhecimento dos riscos radiológicos associados ao seu trabalho, além de estarem devidamente treinados para o desempenho seguro de suas funções ⁴⁰. As normas nacionais são guiadas por recomendações de órgãos internacionais, como os limites de dose equivalente apresentados pela Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP- *International Commission on Radiological Protection*) ³⁷.

2.7.4 Controle de Exposição

O uso de radiações ionizantes demanda o conhecimento básico de três fatores importantes para a garantia do controle de exposição às radiações ionizantes: o tempo de exposição, a distância da fonte e a blindagem.

A dose acumulada é proporcional ao tempo de exposição, portanto, quanto menor o tempo de exposição menor será a dose, portanto, é fundamental que o tempo de permanência em áreas controladas seja o menor possível.

Claramente, quanto maior a distância entre uma fonte de radiação ionizante e o indivíduo menor será a exposição; em caso de fontes consideradas puntiformes é válida a Lei do Inverso do Quadrado da Distância.

A interação da radiação ionizante com o indivíduo é minimizada quando se utiliza blindagem por meio de anteparos com alto índice de atenuação da radiação. Deve-se empregar dispositivos para diminuir o risco de exposição, tais como acessórios plumbíferos - que incluem aventais, saiotas, luvas e óculos-, biombos, colimadores, visores plumbíferos e paredes com aplicação de argamassa baritada ⁴⁰.

É de suma importância para o controle de exposição, também, que os equipamentos emissores de raios X e suas instalações atendam as legislações sanitárias descritas pela portaria nº 453 de 01 de junho de 1998 da ANVISA. São realizados, entre outros, o Controle de Qualidade do equipamento, o teste Levantamento Radiométrico da sala e a avaliação dos acessórios plumbíferos ⁴⁰. Quando atendidas as exigências dos

testes há garantia de redução de dose no público, pacientes e IOEs no que está relacionado ao equipamento.

2.8 Riscos Inerentes da Gestação Humana

Toda gestação apresenta um risco aproximado de 3% a 5% de retardamento mental ou defeito congênito no recém-nascido, não importando a história familiar, médica ou de outras gestações ⁴¹. É fundamental a promoção, implantação e sistematização do atendimento no pré-natal; através de política pública devem ser realizadas com frequência consultas pré-natal em parturientes, especialmente no 1º trimestre da gestação ⁴². A gestação não é classificada com um estado de normalidade fisiológica, mas também não pode ser classificada como um estado patológico, sendo então tratada como um estado especial, onde a gestante e o feto estão sujeitos a riscos físicos, psíquicos e sociais, condição nomeada de estado gravídico ⁴³.

A ferramenta da ultrassonografia obstétrica, desde 1960, é consolidada para acompanhamento da gravidez, permitindo a identificação de grande parte das anormalidades fetais. A medida de translucência nuchal, realizada com ultrassom morfológico, deve ocorrer entre a 11ª e a 14ª semana de gestação (contadas a partir do primeiro dia da última menstruação) ⁴⁴, observando-se a região da nuca do feto. Uma medida aumentada pelo acúmulo de fluido da nuca do feto pode significar um risco a saúde do feto. Esse aumento está relacionado com diversas anomalias cromossômicas, síndromes genéticas, malformações e cardiopatias congênitas. A medida de translucência nuchal define grupos de alto e baixo risco ⁴⁵.

Através da ultrassonografia obstétrica também é possível avaliar o crescimento intrauterino do feto e alguns distúrbios cromossômicos que são associados a restrição de crescimento intrauterino, em inglês *IntraUterine Growth Restriction* (IUGR) ^{44, 45}. Agentes como drogas, pressão alta, desnutrição e a exposição à radiação ionizante podem influir negativamente no desenvolvimento fetal ao longo da gestação.

Alguns agentes teratógenos, como o raio X, são também mutagênicos, e a distinção fundamental entre teratogênicos e agentes mutagênicos é que os agentes mutagênicos causam lesão através da criação de alterações hereditárias no material genético, enquanto os teratógenos atuam direta e transientemente nos tecidos

embrionários em desenvolvimento. Desse modo, a exposição fetal a agentes mutagênicos pode causar um risco aumentado de defeitos congênitos ou outras doenças (como câncer) ao longo da vida do indivíduo exposto e até mesmo nos seus descendentes, enquanto a exposição a teratógenos aumenta o risco de defeitos congênitos na gestação atual, mas não nas próximas.

2.9 Normas para uso de radiações ionizantes

Algumas das principais organizações de importância internacional para sistematização de recomendações de uso das radiações ionizantes são: a Comissão Internacional de Unidades e Medidas da Radiação (*International Commission on Radiation Units and Measurements* - ICRU), a Comissão Internacional de Proteção Radiológica (*International Commission on Radiation Protection* - ICRP) e a Agência Internacional de Energia Atômica (*International Atomic Energy Agency* – IAEA).

A ICRU foi instituída em 1925 durante o 1º Congresso Internacional de Radiologia em Londres através de um esforço internacional para o estabelecimento de grandezas e unidades de radiação e radioatividade. Também, estabelece os procedimentos adequados para a realização de medidas e aplicação das grandezas em radiologia clínica e radiobiologia ^{46, 47}.

Em 1928, durante o 2º Congresso Internacional de Radiologia em Estocolmo, foi criado o *International X-ray and Radium Protection Committee*; em 1950 passou por uma reestruturação e passou a ser chamado de ICRP, tendo como objetivo a sistematização de recomendações em radioproteção ^{46, 47}.

No ano de 1954, seguindo a proposta do então presidente dos Estados Unidos da América, Dwight D. Eisenhower, foi criada uma organização internacional voltada aos usos pacíficos da energia atômica: a IAEA. Através de um fórum intergovernamental há cooperação científica e técnica do uso pacífico da tecnologia nuclear ^{46, 47}.

Esses três órgãos internacionais trabalham juntamente à Organização Mundial da Saúde (OMS) e a UNSCEAR, dentre outros órgãos, para o estabelecimento de normas e recomendações para o uso de radiações ionizantes. Os estudos científicos, projetos e recomendações desses órgãos são constantemente atualizados e cabe a cada país a

aplicação e utilização dessas recomendações. O órgão responsável no Brasil é a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN)³⁹.

A CNEN é desde 1999 uma autarquia federal vinculada ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), foi criada em 1956 e suas funções principais são: regular o uso da energia nuclear no Brasil, pesquisar e desenvolver a aplicação de técnicas nucleares. Possui três diretorias: Diretoria de Radioproteção e Segurança Nuclear, Diretoria de Pesquisa e desenvolvimento e Diretoria de Gestão Institucional. Para a realização de suas tarefas conta com institutos de pesquisa que, além de buscarem novas técnicas nucleares, auxiliam no licenciamento e controle do setor nuclear. A CNEN possui 9 grupos de normas aplicadas, das quais o grupo 3 dispõe de itens de proteção radiológica; no qual está publicada a norma CNEN-NN-3.01 “Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica” de 2011, que apresenta através de posições regulatórias os níveis de restrições de dose apresentados na tabela 4³⁹. No relativo à proteção radiológica de gestantes, segundo a Norma Experimental CNEN-NE-3.01 a dose no abdômen em mulheres com capacidade reprodutiva não deve exceder 10 mSv, em qualquer período de três meses consecutivos. E a dose acumulada no feto durante o período de gestação não deve exceder a 1 mSV³⁹.

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), agência reguladora vinculada ao Ministério da Saúde (MS), exerce o controle sanitário de serviços de saúde; que inclui o uso de radiações ionizantes para fins diagnósticos. Essa autarquia criada em 1999 tem a missão de *“promover e proteger a saúde da população e intervir nos riscos decorrentes da produção e do uso de produtos e serviços sujeitos à vigilância sanitária, em ação coordenada com os estados, municípios e o Distrito Federal, de acordo com os princípios do Sistema Único de Saúde, para a melhoria da qualidade de vida da população brasileira”*. Dentre os direitos fundamentais previstos na Constituição da República Federativa do Brasil de 1988 está o direito à saúde, sendo reconhecido como um direito de todos e dever do Estado. Garantido mediante políticas sociais e econômicas que visam à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação, então, em 1990 foi criado, através de lei federal, o Sistema Único de Saúde (SUS).

Em dezembro de 1994 a resolução SS-625 aprovou a norma técnica que dispõe sobre o uso, posse e armazenamento de fontes de radiação ionizante no Estado de São Paulo. A resolução SS-625 foi substituída em junho de 1998, quando foi aprovado o

regulamento técnico do Ministério da Saúde, junto ao Serviço de Vigilância Sanitária, a portaria nº 453; que estabelece as diretrizes básicas de proteção radiológica em radiodiagnóstico médico e odontológico, dispondo sobre o uso de raios X diagnósticos em todo território nacional.

A portaria 453/98, em seu item 4.29, preconiza que deve ser evitada exposição de abdômen ou pelve de mulheres grávidas ou que possam estar grávidas, a menos que existam fortes indicações clínicas. As informações sobre possível gravidez devem ser obtidas da própria paciente, sendo que se a mais recente menstruação esperada não ocorreu e não houver outra informação relevante, a mulher deve ser considerada grávida⁴⁰. Outro objetivo deste conjunto normativo é garantir a qualidade de imagens radiográficas evitando-se a reexposição desnecessária à radiação de pacientes e profissionais⁴⁰. A tabela 4 apresenta os valores de níveis de referência de dose de radiodiagnóstico por radiografia para um paciente adulto típico. É importante frisar que os níveis de referência servem como uma orientação, não sendo valores de restrição de dose⁴⁰.

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).

EXAME	PROJEÇÃO	DEP (mGy) ^(a)
Coluna lombar	AP	10
	LAT	30
	JLS	40
Abdômen, urografia e colecistografia	AP	10
Pelve	AP	10
Bacia	AP	10
Tórax	PA	0,4
	LAT	1,5

Coluna Torácica	AP	7
	LAT	20
Odontológico	Periapical	3,5
	AP	5
Crânio	AP	5
	LAT	3
Mama	CC com grade	10
	CC sem grade	4

(a) DEP, dose de entrada da pele.

(b) Notas: PA: projeção pósterio-anterior; AP: projeção antero-posterior; LAT: projeção lateral; CC: projeção crânio-caudal; JLS: junção lombo-sacro.

Na portaria 453/98, também são descritos os níveis de dose de referência para exames de tomografia computadorizada (CT). A tabela 5 apresenta os valores de níveis de referência de dose de radiodiagnóstico em CT para um paciente adulto típico. Vale ressaltar que esse tipo de exame é amplamente utilizado para pacientes de traumatismo.

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).

Exame	Dose média em cortes múltiplos (mGy)^(a)
Cabeça	50
Coluna lombar	35
Abdômen	25

(a) determinada no eixo de rotação em fantoma de água, com comprimento de 15 cm e diâmetro de 16 cm para cabeça e com comprimento de 30 cm e diâmetro de 30 cm para coluna e abdômen.

Além dos valores de referência para diversos tipos de exame a legislação sanitária, descrita pela Portaria 453/98 da ANVISA, estabelece que para IOEs gestantes devem ser observados alguns requisitos adicionais: a gravidez deve ser notificada ao titular do

serviço tão logo seja constatada e as condições de trabalho devem ser revistas para garantir que a dose na superfície do abdômen não exceda 2 mSv durante todo o período restante de gravidez, tornando pouco provável que a dose no embrião ou feto exceda cerca de 1 mSv neste período ⁴⁰. Visto que, na portaria nº 453/98, o feto deve ser tratado como indivíduo do público, é imprescindível durante o período pré-natal a aplicação de todos os fatores de proteção radiológica, já que os principais efeitos da irradiação no embrião e no feto incluem os efeitos letais no embrião (morte intrauterina), as malformações e alterações estruturais e de crescimento, o retardo mental e a indução de câncer.

No Brasil, além do controle de exposição e o uso dos equipamentos emissores de raios X serem controlados pelo MCTI e MS há também o Ministério do Trabalho e Emprego (MTE) que através da Norma Regulamentadora 32 (NR 32 – Segurança e Saúde no Trabalho em Serviços de Saúde) trata da segurança e saúde no trabalho em serviços de saúde; estabelecendo que toda trabalhadora com gravidez confirmada deve ser afastada das atividades com radiações ionizantes, devendo ser remanejada para atividade compatível com seu nível de formação (item 32.4.4).

Não há estabelecido nas normas do Brasil um consenso para o valor de limite de dose para gestantes e fetos. Enquanto a ANVISA e a CNEN têm estipulados valores baixos, que podem ser alcançados com a realização de um único exame com raios X na região pélvica, a NR32 demanda que a IOE gestante deve ser afastada. Provavelmente, essas normas dão a entender que não se deve irradiar gestantes e para tanto apresentam valores muito baixos de dose absorvida.

2.10 Equipamentos emissores de raios X no Brasil

No Brasil existem, segundo dados da Secretaria de Atenção à Saúde- SAS/MS, em janeiro de 2019, 132.249 equipamentos para obtenção de imagem médica, distribuídos pelas regiões do país conforme a tabela 6 ⁴⁸.

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.

	Região Norte	Região Nordeste	Região Sudeste	Região Sul	Região Centro- Oeste	Brasil
Mamógrafos ^(a)	368	1.324	2.826	936	507	5.961
Raios X diagnóstico ^(b)	1.599	5.257	13.410	4.119	2.369	26.754
Raios x procedimento ^(c)	113	352	1.527	479	186	2.657
Raios X odontológico	2.256	8.386	28.141	11.475	3.316	53.574
Tomografia Computadorizada	292	867	2.316	839	500	4.814
Ultrassom ^(d)	2.418	9.210	18.865	6.927	3.491	40.911
Ressonância Nuclear Magnética	154	430	1.285	464	245	2.578

(a) Inclui: “mamógrafo com comando simples”, “mamógrafo com estereotaxia” e “mamógrafo computadorizado”.

(b) Inclui: “raio X até 100mA”, “raio X de 100 a 500 mA”, “raio X mais de 500 mA” e “raio X para densitometria óssea”.

(c) Inclui: “raio X com fluoroscopia” e “raio X para hemodinâmica”.

(d) Inclui: “ultrassom doppler colorido”, “ultrassom ecografo” e “ultrassom convencional”.

A projeção da população do Brasil e das unidades da federação, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em janeiro de 2019 é apresentada na tabela 7 ⁴⁹:

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/>).

	População estimada (Jan/19)	Porcentagem da População
Região Norte	18.316.551	8,75%
Região Nordeste	56.934.011	27,19%
Região Sudeste	88.066.218	42,06%
Região Sul	29.870.516	14,27%
Região Centro-Oeste	16.197.492	7,74%
Brasil	209.384.788	100%

A comparação da porcentagem do número de equipamentos e da população por região do país é apresentada na tabela 8.

Tabela 8: Porcentagem da população, equipamentos de raios X diagnóstico e ultrassom para cada região do país em janeiro de 2019.

	Porcentagem da População	Raios X diagnóstico	Ultrassom
Região Norte	8,75%	5,98%	5,91%
Região Nordeste	27,19%	19,65%	22,51%
Região Sudeste	42,06%	50,12%	46,11%
Região Sul	14,27%	15,40%	16,93%
Região Centro-Oeste	7,74%	8,85%	8,53%
Brasil	100%	100%	100%

2.11 Uso de Animais em Pesquisas com Radiações Ionizantes

A pesquisa científica com animais tem um papel vital no desenvolvimento de conhecimentos na área da saúde; no século XX, a compreensão de diversos tipos de doenças foi possível através desse tipo de pesquisa. O uso de animais pode apresentar dados fundamentais de parâmetros biológicos e comportamentais através de técnicas bem estabelecidas. A escolha do animal utilizado no experimento depende da pesquisa, das instalações do local da pesquisa e da disponibilidade de animais.

Os ratos são amplamente utilizados em pesquisa com radiações ionizantes devido a seu tamanho reduzido, alta taxa reprodutiva, rápido desenvolvimento corpóreo, fácil manipulação, boa capacidade de aprendizado e menor tempo de vida em relação aos humanos, permitindo investigar efeitos a longo prazo ⁵. Ainda, é possível com ratos a manipulação de todos os fatores ambientais influentes no desenvolvimento e bem-estar do animal ⁵.

Os modelos experimentais de avaliação comportamental em roedores selecionados neste estudo são amplamente utilizados na avaliação de risco e evidenciam danos aos efeitos do sistema nervoso central. O comportamento pode ser descrito como a

resposta da interação de um organismo com o ambiente em que vive ou a ligação de seu sistema nervoso com o ecossistema ao seu redor ⁵⁰. O estudo do comportamento pode relacionar aspectos moleculares e fisiológicos aos estímulos incondicionados ⁵⁰.

Em pesquisas comportamentais que utilizam roedores estuda-se a resposta desses animais quando expostos a novos ambientes. Três características comportamentais de roedores que são exploradas em experimentos ansiolíticos são: aversão natural a áreas iluminadas, tigmotaxia (comportamento característico que os leva a permanecer em contato com superfícies verticais) e neofilia (comportamento de explorar espaços novos, mesmo que com estímulos ameaçadores). A ansiedade é uma emoção humana caracterizada por um estado de agitação desagradável, motivada pela inquietação e preocupação, que pode levar a transtornos. Em animais, a ansiedade é o resultado dos impulsos conflitantes entre a tigmotaxia e a neofilia; a diminuição da ansiedade leva ao aumento do comportamento exploratório e, de forma antagônica, o aumento da ansiedade leva a uma menor exploração e tendência a permanecer em contato físico com superfícies verticais ⁵¹. O termo emocionalidade também é utilizado para animais, advindo da psicobiologia, denotando um aumento geral do estado emocional ou uma condição excitada do animal ⁵².

Através da habilidade do animal para adquirir e utilizar informações espaciais, bem como a habituação à atividade exploratória ao longo do tempo em que está sendo testado, é possível avaliar, então, a ansiedade dos ratos através das respostas comportamentais. Aliado aos testes comportamentais existem testes de reflexo do desenvolvimento neurológico que permitem a determinação de mudanças causadas por lesão cerebral e anormalidades no desenvolvimento da prole ⁵³.

A correspondência entre os estágios embrionários de humanos e ratos é descrita por Hill ⁵⁴, possibilitando extrapolar ao homem as observações feitas em ratos quanto ao período de irradiação. A radiação ionizante tem seu efeito diretamente sobre o feto, diferindo dos fármacos; portanto, não há preocupações com diferenças no metabolismo, absorção ou transferência placentária entre o modelo animal e o humano ¹⁶.

A exposição à baixas doses de radiação ionizante durante o período de maturação no desenvolvimento intrauterino pode desencadear nos animais expostos alterações comportamentais ⁵⁵. Foram relatados danos cerebrais no período pós-natal em ratos expostos durante o desenvolvimento intrauterino ¹⁸, esses efeitos deletérios no comportamento pós-natal alterado podem ser relacionados à danos no córtex cerebral

durante o desenvolvimento fetal ^{6, 56}. Estudos com crianças expostas durante o desenvolvimento intrauterino pela bomba atômica de Hiroshima identificaram clinicamente retardo mental com escores reduzidos de quociente de inteligência (QI) ^{8, 13}.

2.11.1 Ratos Wistar

Em 1906 foi estabelecida uma colônia de ratos no Instituto Wistar na Filadélfia da qual origina-se grande parte das linhagens de ratos Wistar utilizados mundialmente. Os ratos Wistar são uma linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus* e sua importância na pesquisa mundial se deve, em parte, ao fato de seus dados fundamentais terem sido muito bem detalhados através de diversas pesquisas, estando bem descritos na literatura desde 1915 ⁵⁷. São caracterizados pelas orelhas alongadas, cabeça grande e comprimento da cauda sempre menor que o comprimento corporal. A Figura 8 apresenta a foto de um rato Wistar com 20 dias de idade utilizado no experimento dessa tese.



Figura 8: Foto de um rato Wistar macho com 20 dias de idade.

A gestação dura de 20 a 22 dias e o desmame ocorre com 17 a 19 dias de idade. São considerados animais dóceis, de fácil manipulação e tem boa capacidade de aprendizado. Apresentam, em geral, baixa incidência tumoral e a partir da linhagem Wistar foram desenvolvidas as linhagens Sprague Dawley e Long-Evans.

3. Materiais e Métodos

O experimento dessa tese foi desenvolvido e realizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP – Campus de Botucatu). Os ratos Wistar foram obtidos junto ao Biotério Central e, após autorização e aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais (protocolo 887/2016-CEUA), ficaram alocados no Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB UNESP-Botucatu). Os animais foram irradiados no Setor de Radiologia Veterinária do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ UNESP – Campus de Botucatu), os estudos comportamentais foram realizados no Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX – Unidade Auxiliar do IBB – UNESP) e as análises estatísticas foram realizadas no Departamento de Física e Biofísica do IBB -UNESP. Todos os experimentos foram realizados entre maio de 2016 e janeiro de 2017 e durante a realização desse trabalho nenhum animal morreu em decorrência dos testes utilizados.

Foram analisados dados fisiológicos de ratos irradiados durante o desenvolvimento intrauterino e suas genitoras durante o pré e pós-natal, também, estudos comportamentais foram realizados na prole. Em estudos comportamentais de ratos Wistar utiliza-se apenas os ratos machos, que tendem a apresentar comportamento menos disperso que as fêmeas, e foi estabelecido um número ideal de 4 filhotes (F1) por rata genitora (F0)⁵⁸. Durante o delineamento desse projeto respeitou-se todos os princípios éticos do uso de animais em pesquisa, com enfoque no bem-estar animal e aplicando a redução no número de animais utilizados e o refinamento da pesquisa⁵⁹.

3.1 Princípios éticos para o uso de animais

Esta pesquisa está de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os procedimentos para experimentos animais foram pré-aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (887/2016-CEUA) e todas as experiências e métodos empregados no uso de animais desta pesquisa foram realizados de acordo com as diretrizes e regulamentos.

3.2 Animais e seleção dos grupos

Foram utilizados 45 ratas e 15 ratos Wistar, albinos e virgens, com idade média de 85 dias e peso médio de 150 e 230 g, respectivamente. Esses animais foram ambientados por vinte dias antes do início dos experimentos no biotério. Os animais ficaram alojados em grupos de cinco animais do mesmo sexo em gaiolas de polipropileno (40 x 50 x 20 cm), com a temperatura ambiente controlada ($23 \pm 2^\circ \text{C}$), em um ciclo claro/escuro de 12 horas começando as 6:00 e estavam disponíveis *ad libitum* durante todo o experimento ração padrão em pellets própria para ratos (Marca Presence[®], Brasil) e água da torneira. Na Figura 9 é possível ver a disposição dos animais no biotério do departamento de Fisiologia.



Figura 9: Disposição das caixas de animais alocados durante o experimento.

O acasalamento ocorreu durante o período noturno, em cada caixa que continha fêmeas (total de 9 caixas) foi colocado um rato macho no início da noite e retirado logo

pela manhã, realizou-se um sistema de rodizio para os ratos. As fêmeas, pela manhã, foram examinadas através do teste de esfregaço vaginal para averiguar o acasalamento. A presença de espermatozoides no conteúdo do esfregaço vaginal, avaliada na visualização de lâmina com o uso de um microscópio, confirmou o acasalamento. É apresentado na Figura 10 o processo de avaliação do teste de esfregaço. Após a confirmação, as fêmeas foram alojadas individualmente e este momento foi designado como o dia gestacional um (DG1).

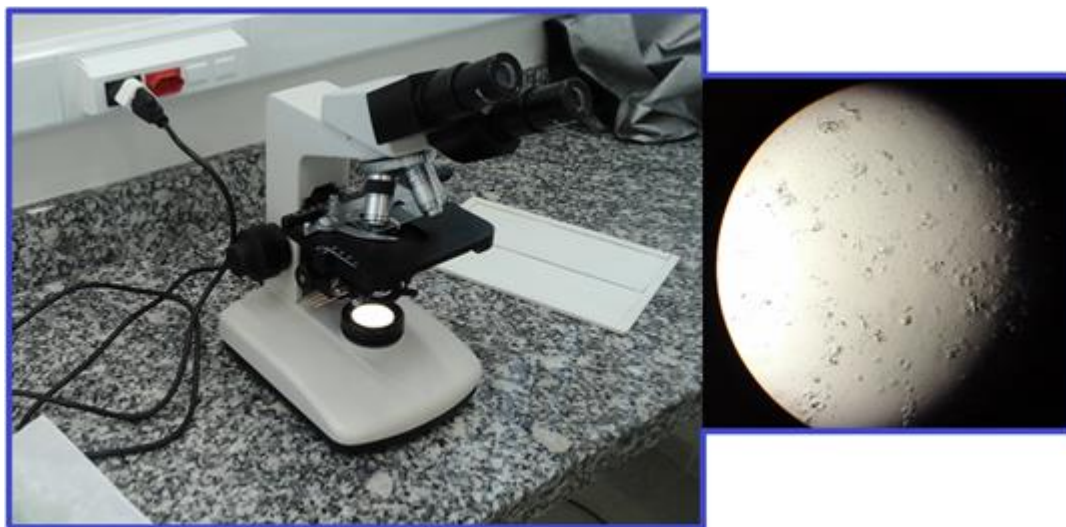


Figura 10: Microscópio utilizado para visualização e imagem da lâmina obtida com teste de esfregaço.

Das 45 ratas F0, 6 tiveram resposta falso positivo para prenhez, 1 sofreu aborto com 18 dias de prenhez e 2 não tiveram filhotes suficientes para a seleção de 4 machos. Sendo assim, as 36 ratas com confirmação de prenhez e condições necessárias foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais (N = 36): controle (CTL, N = 12), irradiado no oitavo dia de prenhez (IR8d, N = 12) e irradiado no décimo quinto dia de prenhez (IR15d, N = 12).

3.3 Irradiação e acompanhamento pós-natal

A irradiação das ratas prenhas foi realizada utilizando um equipamento de raios X da marca Shimadzu Corporation, modelo EZy-Rad, fabricado em janeiro de 2008, com o

número de série do equipamento 0662P42407, número de série do tubo 7M0282, número de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária 10369010031 e número de patrimônio da FMVZ 020354. Esse equipamento é alimentado por uma tensão de 220 V com gerador de alta frequência multi-pulso, a energia do feixe do aparelho varia de 40 a 125 kV, o tempo de exposição varia de 2,5 milissegundos a 2 segundos e a corrente do tubo varia de 63 a 200 miliamperes. O equipamento possui filtração total inerente de 2,5 mmAl (1,5 mmAl do tubo somado a 1,0 mmAl do colimador) e foco único de 1,2 mm. Esse equipamento apresentava conformidade em todos os testes do relatório de controle de qualidade no período das irradiações.

A contenção dos animais durante a exposição se deu por um dispositivo de lucite, circular (9 cm de altura por 19 cm de diâmetro), que acomodava um animal por vez sem imobilizá-lo. Esse dispositivo garantiu que todo o corpo do animal foi irradiado e que o animal estava no feixe primário de raios X, conforme apresentado na Figura 11. A Figura 12 apresenta uma imagem radiológica de uma das ratas prenhas do grupo irradiado no 15º dia de gestação, não é possível quantificar o número de filhotes e devido ao movimento da cabeça há falta de definição nessa região da imagem..



Figura 11: Posicionamento dos animais durante a exposição, detalhe do dispositivo de contenção para irradiação do animal.



Figura 12: Imagem radiológica de uma das ratas durante o 15º dia de gestação.

Para garantir que o valor de exposição nas ratas prenhas fosse de 15 mGy foram realizadas medidas de leitura com uma câmara de ionização com certificado de calibração atualizado e o valor de leitura foi corrigido pelo fator de calibração, temperatura e pressão da câmara de ionização. A Figura 13 mostra o procedimento para conferência e determinação da dose utilizada. Para as medidas foi utilizado um conjunto composto por uma câmara de ionização (modelo 90x5-6) acoplada a um eletrômetro (modelo 9010), ambos da marca Radcal Corporation. Durante as medidas a câmara de ionização foi inserida no dispositivo de contenção e os parâmetros definidos para obtenção de 15 mGy em uma única exposição foram: 81 kVp, 110 mAs, 0,71 segundos, com distância fonte-objeto de 83 centímetros e campo de colimação totalmente aberto.



Figura 13: Medidas de Kerma no ar do aparelho de raios X.

É de suma importância ressaltar que as fêmeas prenhas do grupo controle (CTL) foram submetidas aos mesmos procedimentos experimentais que as irradiadas; foram transportadas ao Setor de radiologia, foram posicionados individualmente dentro do dispositivo de contenção e também no equipamento emissor de raios X, porém durante todo o período o equipamento permaneceu desligado, ou seja, sem nenhuma produção de raios X. Foi um processo de irradiação *sham*.

Todas as fêmeas (F0) puderam dar à luz e nutrir seus descendentes (F1) normalmente. No dia seguinte ao parto todas as ninhadas foram examinadas, anotou-se quantos animais de cada sexo havia, o número total de filhotes, e, quando ocorreu, o número de animais natimortos. No terceiro dia pós-parto as ninhadas foram reduzidas para quatro machos em cada. O desmame foi realizado quando os animais tinham 21 dias de idade, ficando 4 machos F1 por caixa. Todos os animais foram identificados em suas caudas com canetas coloridas para rastreamento nas avaliações de desenvolvimento físico e comportamental, essa marcação ocorreu duas vezes por semana ou eram refeitas quando necessário.

3.4 Avaliação de resposta fisiológica e desenvolvimento físico

O ganho de peso, resposta fisiológica estudada neste trabalho, foi avaliado e serviu para comparação do desenvolvimento dos animais irradiados com os controles. As fêmeas F0 foram pesadas a cada três dias desde o dia que foram alocadas no biotério até 12 dias após o parto, os animais F1 foram pesados individualmente do dia 1 ao dia 91; com intervalo diário até os 15 dias de idade e após os 15 dias de idade a cada dois dias. Utilizou-se para as medidas dinamômetros (“balanças”) calibrados e foram respeitados os limites de peso. A Figura 14 mostra fotos dos procedimentos de pesagem para recém-nascidos e adultos, respectivamente.



Figura 14: Dinamômetros utilizados para pesagem de animais recém-nascidos (esquerda) e adultos (direita).

O desenvolvimento físico e neurológico dos recém-nascidos foi avaliado por dois testes: o tempo de abertura dos olhos e o teste de geotaxia negativa.

3.4.1 Teste de Abertura dos Olhos

O Teste de Abertura dos Olhos (TAO) pode indicar anormalidades no desenvolvimento neurológico⁵³. Neste teste de observação direta se compara o tempo de latência para a ocorrência da primeira fresta dos dois olhos, e os filhotes foram observados

diariamente desde o dia de nascimento. Todos os animais abriram os olhos e o dia em que os quatro filhotes da mesma ninhada abriram os olhos foi anotado, comparou-se então a diferença de dias levados para a abertura entre os dois grupos irradiados e o controle. Esse teste avalia sinais do desenvolvimento do reflexo de roedores neonatais. A Figura 15 mostra o procedimento de checagem de abertura dos olhos.



Figura 15: Checagem do Teste de Abertura de Olhos, animal com 6 dias de idade e olhos ainda fechados.

3.4.2 Teste de Geotaxia Negativa

O Teste de Geotaxia Negativa (TGN) é utilizado para avaliar o desenvolvimento sensório-motor durante os primeiros dias da vida pós-natal em roedores. Começou a ser realizado no dia 3 após o nascimento dos animais. Nesse teste os filhotes foram posicionados individualmente com a cabeça apontada para baixo em uma rampa de superfície inclinada em relação à bancada em 45° e o tempo necessário para que o filhote virasse pelo menos 90° foi anotado. Antes de conseguir virar no dispositivo é normal que os filhotes não realizem a virada com a subida ou caiam do dispositivo de teste, portanto, foi estabelecido o tempo de duração em 60 segundos para cada animal. Foram registradas as não conclusões de teste e quando os animais conseguiram realizar a virada foram anotados: o número de dias que o animal levou para realizar o teste (em dias) e o tempo necessário para realizar a virada (em segundos). O tempo de primeira virada, em número

de dias, foi considerado quando os quatro filhotes (F1) da mesma ninhada conseguiram realizar o teste ⁶⁰. A Figura 16 apresenta fotos da realização do Teste de Geotaxia Negativa com os ratos Wistar.



Figura 16: Animal recém-nascido no Teste de Geotaxia Negativa e uma sequência de fotos na qual o animal realiza a virada.

3.4.3 Formação de ninhos

Durante o período de 21 dias em que os filhotes estiveram com as mães antes do desmame, foi anotado diariamente a posição do ninho nas gaiolas em relação à iluminação da sala. A formação de ninhos é um reflexo materno que pode refletir em alterações maternas devido à estímulos ambientais ⁶¹. A Figura 17 ilustra como eram anotadas as posições de ninho em relação à luz da sala e a parede onde a gaiola estava encostada.

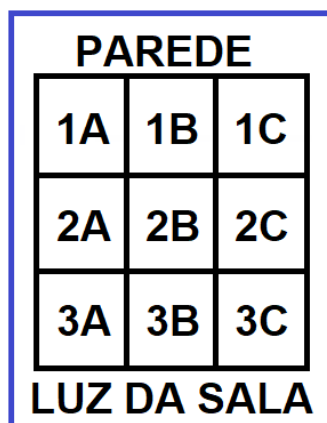


Figura 17: Modelo utilizado para marcar o posicionamento do ninho durante avaliação diária das ratas F0 com os filhotes F1.

3.5 Avaliação neurocomportamental

As avaliações neurocomportamentais relacionadas à ansiedade dos animais foram realizadas através da avaliação por três testes consecutivos: Teste de Arena de Campo Aberto (ACA), Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e o Teste de *Hole Board* (HB). A avaliação foi realizada nos animais em duas idades diferentes: animais jovens com 30 dias de vida e adultos com 70 dias de vida. As respostas comportamentais dos animais só podem ser testadas sem habituação prévia, uma vez que devem capturar o conflito natural entre a exploração e a tendência de evitar novos ambientes ^{62, 63}.

3.5.1 Considerações gerais e condições experimentais

As salas de avaliação comportamental são a prova de som, com temperatura controlada e iluminadas por lâmpadas infravermelhas. Há em todas as salas uma câmera que permite a gravação do teste de cada animal. Devido ao fato de as fêmeas terem emprenhado em dias diferentes não foi possível realizar os experimentos todos em um único dia, portanto, o procedimento de deslocamento dos animais do biotério ao CEATOX foi padronizado: mesma rota, sem conversa entre pessoas que carregavam as caixas, animais de todos os grupos eram levados, e o transporte ocorria no fim de tarde anterior ao período das observações comportamentais, assim os animais passavam a noite no biotério do CEATOX. Todos os testes ocorreram entre as 9:00 e as 11:00 horas, afim de evitar diferentes respostas devido a diferença de atividade relacionada à hora do dia. Os animais foram submetidos aos três testes subsequentemente: ACA, LCE e HB. A seleção do conjunto de testes serve para mitigar a interpretação errônea de resultados obtidos por um único teste ^{64, 65}. Geralmente, uma combinação de testes é utilizada para melhorar a análise das respostas dos animais à estímulos que podem desencadear ansiedade, que é uma condição transitória percebida apenas em determinado momento ⁶³.

As imagens obtidas com as câmeras possibilitaram que pelo menos três avaliadores visualizassem e avaliassem todos os testes para cada animal. Com a finalidade de evitar viés observacional na avaliação comportamental gravada em vídeo, os avaliadores não tinham na hora da análise acesso as informações do grupo ao que o animal pertencia; foram testes cegos. Após a passagem de cada um dos animais pelo dispositivo

as fezes e a urina foram retiradas com papel toalha e os dispositivos de teste foram cuidadosamente limpos com solução de etanol a 5% antes da introdução de outro animal. Todos os cuidados necessários para o manuseio dos animais foram tomados para que não houvesse estresse e possível influência nas respostas obtidas. Os animais foram acostumados a aceitar o manuseio e contenção desde o nascimento, familiarizando-se com os manipuladores; principalmente pela alta frequência em que eram pesados. O manuseio adequado evita alterações de humor, desconforto e aumento da excitação; fatores que podem influenciar os resultados ⁶⁶.

Os testes de ACA e HB são construídos de maneira a não permitir a saída nem a queda de nenhum animal, entretanto, no dispositivo de teste LCE há dois braços abertos e não é incomum a queda de animais. Os animais que caíram tiveram todos os dados comportamentais desconsiderados para análise posterior.

Esses três testes comportamentais são bem estabelecidos e amplamente utilizados em pesquisas com roedores, os dispositivos dos testes utilizados são localizados no CEATOX.

3.5.2 Teste de Arena de Campo Aberto

O teste de Arena de Campo Aberto (ACA), descrito pelo psicólogo americano Calvin S. Hall na década de 1940, é um experimento desenvolvido para analisar os níveis de atividade motora geral, emocionalidade e o comportamento de roedores usados em pesquisa científica ⁶⁷. O dispositivo de teste é constituído por uma arena circular de madeira com 100 cm de diâmetro cercada por paredes com 32 cm de altura, que impedem a fuga do animal. A arena é demarcada com tinta preta e possui áreas demarcadas. São demarcados três círculos concêntricos: central, médio e externo (com diâmetros de 18, 57 e 100 cm, respectivamente), e há quadrantes de subdivisão da área, também pintados, para cada um dos círculos pintados: 6, 6 e 12, respectivamente. Essas demarcações servem para contabilizar a movimentação do animal testado e sua preferência por determinadas áreas. A Figura 18 apresenta fotos com a disposição da câmera e o dispositivo de teste com suas demarcações no CEATOX.



Figura 18: Dispositivo de teste da Arena de Campo Aberto.

Para realização dos testes na ACA cada rato foi colocado individualmente no centro da arena e os movimentos foram registados com uma câmara montada 135 cm acima da arena durante três minutos. Através da análise dos vídeos gravados foi contabilizada a atividade locomotora (número de espaços demarcados que o animal entrou com quatro patas), o número de levantamentos nas patas traseiras (levantamentos nas patas traseiras sem considerar quando os animais estavam com as patas dianteiras apoiadas nas paredes laterais), o tempo gasto para atravessar o centro pela primeira vez (o tempo que o animal levou para atravessar o círculo central com as quatro patas desde o início do testes) e o número de cruzamentos pelo círculo central da arena (número de vezes que o animal cruzou o centro do campo da arena com as quatro patas) ⁶⁸.

3.5.3 Teste de Labirinto em Cruz Elevado

O teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE), desenvolvido em 1984, é utilizado para investigar a ansiedade de roedores ⁶⁹. O dispositivo consiste de dois braços abertos e dois braços fechados de igual comprimento e largura (com dimensões de 50 x 10 cm cada) ligados por um centro - local onde os braços se juntam (com dimensões de 10 x 10 cm). O LCE é elevado do chão em 50 cm, os braços abertos têm uma borda de acrílico com 1 cm de altura e os braços fechados do dispositivo têm paredes com 40 cm de altura

em madeira. A avaliação comportamental no LCE baseia-se no princípio de que o rato pode explorar livremente os braços abertos, que podem ser perigosos devido à altura, mas também pode permanecer protegido e em contato com uma superfície vertical (tigmotaxia) nos braços fechados. Esse conflito permite medir a ansiedade e a atividade exploratória normal – que pode ser diminuída pela indução do medo. O alto número de entradas em braços fechados associado ao longo tempo passado nesses braços pode indicar aumento na ansiedade ⁶⁴. O número de entradas em ambos os braços é usado como uma medida da atividade locomotora ⁷⁰. A Figura 19 apresenta o dispositivo do teste de Labirinto Arena em Cruz Elevado e imagem obtida pela câmera localizada a cima do aparelho durante o teste de um rato adulto, localizado no CEATOX.



Figura 19: Dispositivo de teste do Labirinto Arena em Cruz Elevado.

A avaliação dos animais no LCE foi realizada com o posicionamento individual de cada animal no centro do dispositivo de frente para um braço fechado, o animal pode explorar livremente o dispositivo por cinco minutos. Foram contados através da análise dos vídeos gravados pela câmera montada acima do aparelho: o número de entradas no centro ou nos braços do dispositivo com todas as patas do animal e o tempo que o animal explorou cada setor do dispositivo (em segundos) ⁷¹. Nos casos de queda dos animais do dispositivo houve registro dos eventos, descarte da análise do vídeo e dos dados obtidos no teste de ACA e os animais não foram testados no HB; o animal depois que sofre a

queda está provavelmente com o nível de ansiedade afetado e os dados do teste de HB não seriam confiáveis ⁷².

3.5.4 Teste de *Hole Board*

O teste de *Hole Board* (HB), projetado em 1970, é um método experimental que mede ansiedade, comportamento exploratório e atividade locomotora em roedores. O dispositivo é uma arena de madeira quadrada com 57 cm de arestas (piso) e uma parede circundante de 30 cm de altura. A base do dispositivo tem 81 (9 x 9) furos redondos, cada um com 2,5 cm de diâmetro, distribuídos uniformemente pelo piso e separados uns dos outros por uma distância de 3,5 cm ⁷³. A Figura 20 apresenta a vista superior do dispositivo e a vista inferior do dispositivo obtida pela câmera no teste de *Hole Board*, localizado no CEATOX.



Figura 20: Dispositivo de teste do *Hole Board*.

Cada um dos animais testados foi colocado individualmente no centro do dispositivo e, durante os 5 minutos seguintes, a movimentação foi registrada por uma câmera posicionada abaixo da linha dos furos do dispositivo de teste. Os ratos puderam se locomover livremente durante o teste e o número de enfiadas de cabeça e de patas foi contado através da visualização dos vídeos. A curiosidade do rato faz com que ele cheire as bordas dos furos do dispositivo, enfiando por vezes a cabeça totalmente no buraco. As

enfiadas de cabeça somente foram contabilizadas quando ambos os olhos transpassaram o nível do orifício. É normal que os animais caiam nos buracos com as patas, porém um número aumentado de quedas pode demonstrar perda de coordenação motora. As enfiadas de pata somente foram contadas quando houve passagem de todos os dedos pelo orifício

⁷⁴.

3.6 Análise estatística

A grande quantidade de dados analisados demandou a retirada de *outliers* (valores atípicos com grande afastamento dos demais valores da série) com o método baseado na amplitude interquartil. Para determinar a significância das diferenças fisiológicas e comportamentais entre os grupos irradiados e de controle utilizou-se a Análise de Variância Unidirecional (ANOVA) em conjunto com o teste de Tukey da diferença honestamente significativa (Honestly Significant Difference - HSD). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software STATISTICA ⁷⁵. Os resultados foram considerados significativos para valores com $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Avaliação das fêmeas F0

Todas as ratas prenhas ganharam peso normalmente e não houve diferença significativa entre o peso das ratas (F0) irradiadas (15 mGy nos dias gestacionais 8 e 15) e controle ($P > 0,48$). A duração da gestação ($P > 0,7$) e o tamanho da ninhada ($P > 0,3$) também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos irradiados e o controle. Além disso, não foi observada mortalidade em decorrência da gestação em nenhum grupo. Os dados de peso corporal médio de ratas antes e depois do parto, tamanho da ninhada e duração da gestação, descritos para animais irradiados (8º dia de gestação [IR8d] ou 15º de gestação [IR15d]) e controle (CTL – não irradiados) são apresentados na tabela 9 (Os valores são representados como a média $\pm$ erro padrão, $n=36$). A Figura 21 apresenta a evolução dos pesos médios das ratas F0 4 dias antes do parto até o 3º dia pós-parto.

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.

	CTL (n=12)	IR8d (n=12)	IR15d (n=12)
Peso corporal F0 antes do parto (g)	321,7 ± 9,6	332,3 ± 13,5	342,1 ± 13,4
Peso corporal F0 depois do parto (g)	260,4 ± 6,3	276,1 ± 8,7	266,6 ± 8,9
Tamanho da ninhada	10,1 ± 0,5	10,2 ± 0,7	10,9 ± 0,8
Tempo de gestação (dias)	22,0 ± 0,1	21,7 ± 0,2	21,8 ± 0,3

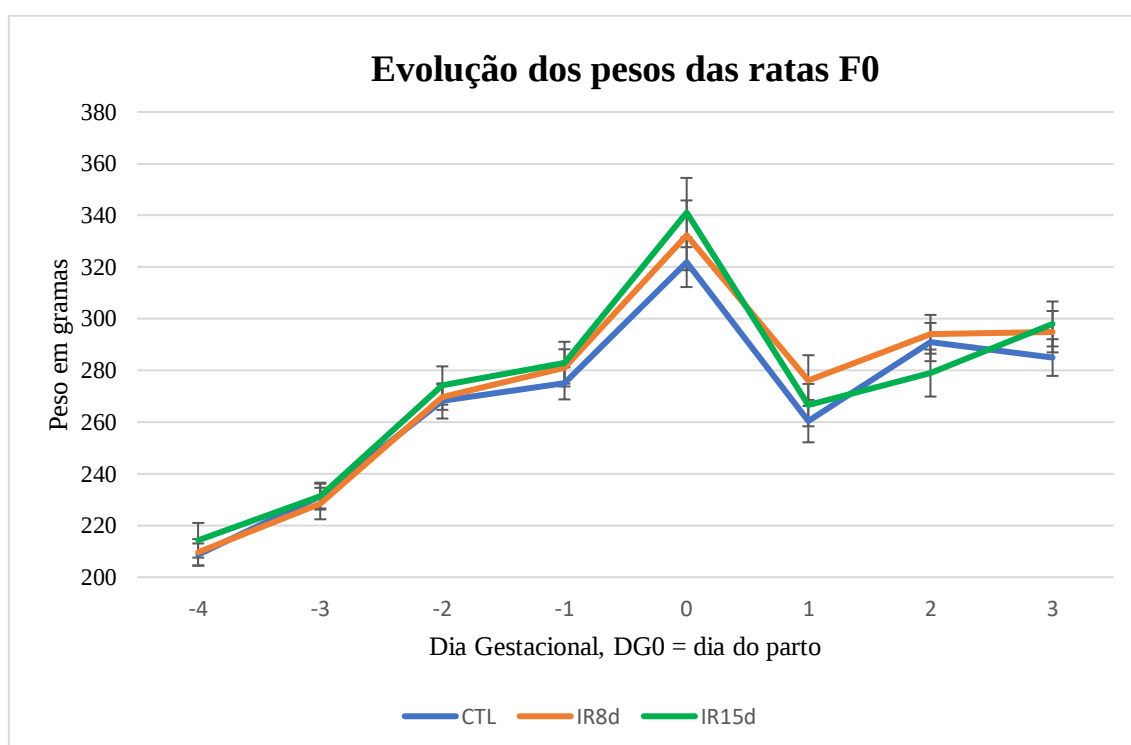


Figura 21: Evolução do peso das ratas F0 antes e depois do parto (n = 36, 12 fêmeas por grupo).

O padrão de formação de ninhós para as fêmeas F0 de todos os três grupos está apresentado na Figura 22. A gaiola está representada de maneira que a parte próxima a legenda é a frente da gaiola (voltada para a luz).

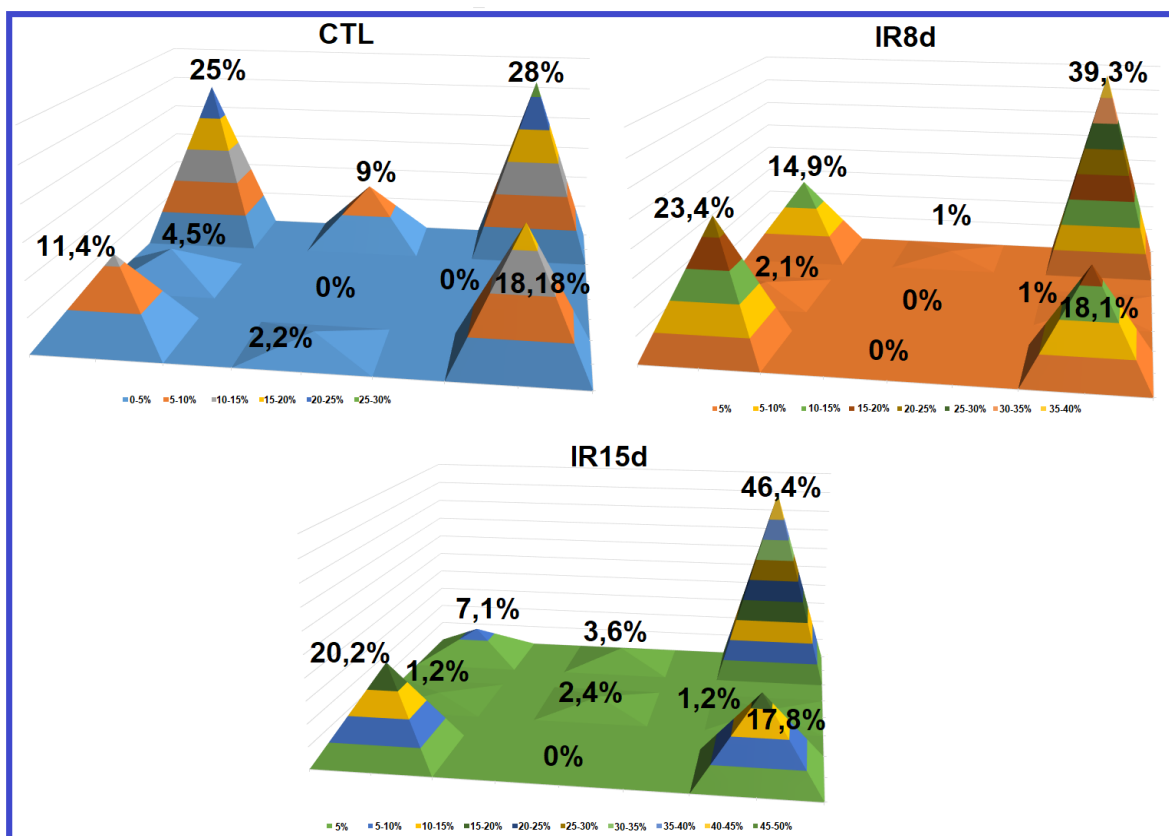


Figura 22: Distribuição percentual dos ninhos das fêmeas F0 dos grupos Controle (CTL), Irradiadas no 8º dia de gestação (IR8d) e Irradiadas no 15º dia de gestação (IR15d) durante o período antes do desmame (total de 720 anotações, ninhos de 12 fêmeas por grupo anotados durante 20 dias).

4.2 Efeitos da exposição intrauterina no peso corporal pós-natal

Não houve diferença significativa entre os pesos dos filhotes (F1) irradiados (IR8d e IR15d) e controles (CTL) para 96 horas de idade ($P > 0,75$) e para 30 dias de idade ($P > 0,6$); no entanto, os pesos corporais dos animais F1 com idades a partir dos 70 dias de idade até os 91 dias foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os animais do grupo controle (CTL) e dos grupos irradiados (IR8d e IR15d). Os ratos IR8d e IR15d tiveram menor ganho de peso quando comparados aos animais do grupo controle a partir dos 70 dias de idade. A tabela 10 apresenta o peso corporal médio de animais F1 irradiados (IR8d e IR15d) comparados aos pesos de animais F1 controle (CTL), os valores são representados como a média $\pm$ erro padrão. A Figura 23 apresenta a curva de evolução da média dos pesos desde o nascimento até os 91 dias de idade para os animais F1 dos três grupos.

Tabela 10: Peso corporal médio de animais F1 irradiados (IR8d e IR15d) comparados aos pesos de animais F1 controle (CTL).

	CTL (n=48)	IR8d (n=48)	IR15d (n=48)
Peso corporal de F1 com 96 horas de vida (g)	12,2 ± 0,1	12,4 ± 0,1	12,4 ± 0,3
Peso corporal de F1 com 30 dias de vida (g)	100,0 ± 2,2	102,2 ± 1,2	100,6 ± 1,5
Peso corporal de F1 com 70 dias de vida (g)	383,8 ± 5,9	331,7 ± 2,0**	355,1 ± 2,8**
Peso corporal de F1 com 91 dias de vida (g)	474,5 ± 4,8	412,5 ± 4,7**	441,2 ± 2,6**

**** $P < 0.01$, ANOVA seguido de teste HSD de Tukey, comparado ao controle (CTL).**

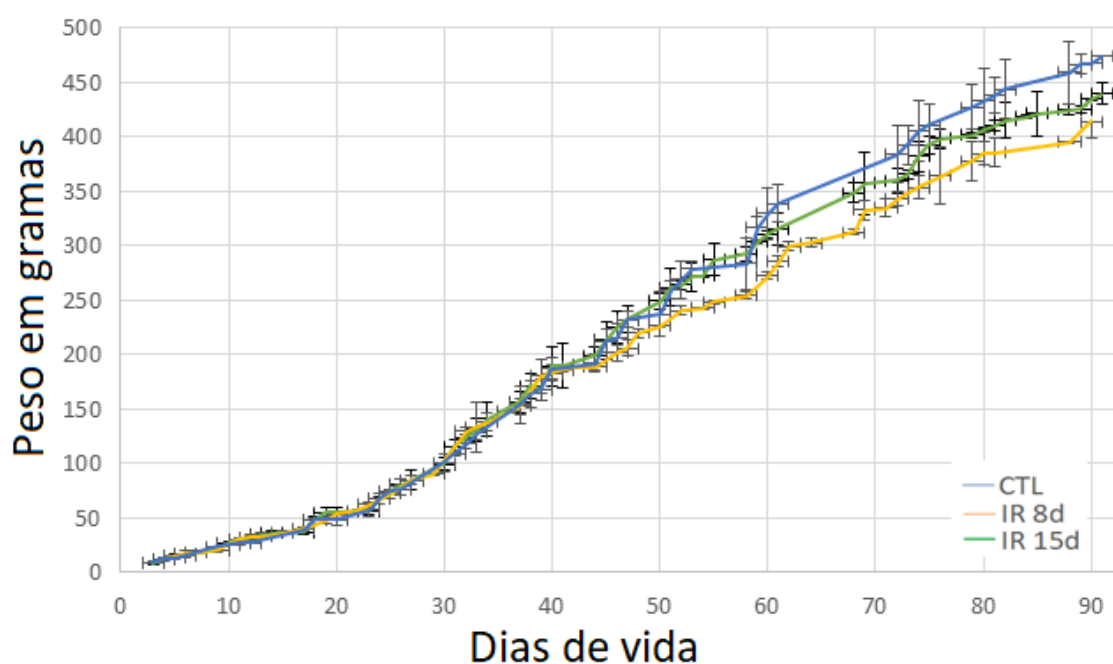


Figura 23: Gráfico do peso corporal médio de animais F1 irradiados (IR8d e IR15d) e controle (CTL) em relação à idade em dias.

4.3 Desenvolvimento neurológico precoce

A avaliação inicial do desenvolvimento neurológico serviu para verificar se a exposição a baixas doses de radiação ionizante intrauterina foi capaz de alterar permanentemente o desenvolvimento do sistema nervoso. Para tanto, foram analisados os resultados obtidos pelos testes de abertura dos olhos e geotaxia negativa.

Os animais do grupo IR8d abriram os olhos significativamente depois dos animais CTL ($P < 0,01$), fato que não ocorreu para os animais do grupo IR15d, conforme apresentado na tabela 11. Este foi o primeiro fator indicativo de que a irradiação pré-natal, especificamente no 8º dia gestacional, poderia prejudicar o desenvolvimento sensorio-motor e a capacidade de resposta do sistema nervoso em animais recém-nascidos.

No teste de geotaxia negativa foram analisados: o número médio de dias em que cada grupo realizou sua primeira subida após o nascimento e o tempo em segundos que os animais realizaram a virada com 15 dias de idade. Observou-se que os animais IR8d e IR15d fizeram suas primeiras viradas significativamente mais tarde ($P < 0,05$) do que os animais CTL. Os dados apresentados na tabela 11 são dos testes de neurodesenvolvimento em ratos recém-nascidos dos grupos controle (CTL) e irradiados (IR8d e IR15d), os valores são representados como a média $\pm$ erro padrão. De forma marcante, os animais do grupo IR8d precisaram de um tempo maior para a primeira virada. No entanto, o tempo médio de subida, aos 15 dias de idade, não apresentou diferença estatística.

Tabela 11: Testes de neurodesenvolvimento em ratos recém-nascidos dos grupos controle (CTL) e irradiados (IR8d e IR15d).

Tratamento	CTL (n=48)	IR8d (n=48)	IR15d (n=48)
Abertura de olhos (dias)	12,8 $\pm$ 0,2	15,2 $\pm$ 0,7**	12,3 $\pm$ 0,2
Primeira virada (dias)	9,4 $\pm$ 0,4	14,4 $\pm$ 0,5**	12,2 $\pm$ 0,2**
Tempo para virada aos 15 dias de idade (s)	5,4 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 0,3	5,9 $\pm$ 0,2

** $P < 0.01$, ANOVA seguido de teste HSD de Tukey, comparado ao controle (CTL).

4.4 Ansiedade dos animais F1

O comprometimento do desenvolvimento neurológico induzido pela exposição a baixas doses de radiação ionizante intrauterina, especialmente no 8º dia gestacional, é uma evidência de que a responsividade do sistema nervoso está alterada. Procurou-se investigar se a exposição pré-natal também poderia gerar ansiedade ao longo do desenvolvimento dos animais e se seus efeitos seriam amenizados ou agravados com a idade. Para tanto, os testes de Arena de Campo Aberto (ACA), Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e *Hole Board* (HB) foram realizados para a idade jovem (30 dias de idade) e adulta

dos ratos (70 dias de idade). Esse conjunto de testes mede indiretamente a ansiedade e a coordenação motora através de medidas de atividades exploratórias e locomotoras.

No teste de ACA quatro parâmetros comportamentais foram analisados: número de espaços demarcados que o animal cruzou com as quatro patas, número de levantamento nas patas traseiras, tempo para primeira travessia do centro e número de cruzamentos pelo centro ⁶⁸. O número de espaços demarcados cruzados por ratos jovens do grupo IR8d (ratos com 30 dias de idade) foi significativamente maior que os cruzados por ratos jovens do grupo CTL ($P < 0,01$) e nenhuma diferença significativa foi detectada na comparação de ratos jovens do grupo IR15d com o grupo CTL. Para ratos adultos (70 dias de idade), o número de espaços atravessados por ratos irradiados (IR8d e IR15d) foi significativamente menor ($P < 0,01$) do que os cruzados por ratos adultos do grupo CTL com a mesma idade. O número de levantamentos nas patas traseiras também foi significativamente diferente entre os grupos irradiados e o controle: os animais IR8d apresentaram mais levantamentos do que o grupo controle ($P < 0,01$) e, inversamente, os animais IR15d apresentaram menor número de levantamentos ($P < 0,01$).

O tempo para primeira travessia do centro e o número de cruzamentos pelo centro para ratos jovens e adultos dos grupos irradiados e do controle não apresentou diferença estatisticamente significativa. Portanto, não houve, para esses dois parâmetros do teste, sensibilidade a mudanças de atividades exploratórias. A tabela 12 apresenta os dados da avaliação do 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), os valores apresentam a média $\pm$ erro padrão.

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).

Parâmetro	Jovens			Adultos		
	CTL (n=48)	IR8d (n=48)	IR15d (n=48)	CTL (n=47)	IR8d (n=40)	IR15d (n=47)
Número de quadrados andados	87,6 ± 0,9	102,9 ± 1,4**	83,8 ± 1,6	76,2 ± 1,7	54,9 ± 2,5**	65,8 ± 0,9**
Levantamento nas patas traseiras	5,3 ± 0,1	7,6 ± 0,1**	3,1 ± 0,2**	3,3 ± 0,3	6,5 ± 0,4**	2,7 ± 0,3
Tempo para primeira passagem pelo centro (s)	163,1 ± 5,9	172,4 ± 4,6	166,8 ± 3,9	176,8 ± 1,6	175,4 ± 2,2	175,9 ± 2,5
Número de cruzamentos pelo centro	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1

****P < 0.01**, ANOVA seguido de teste HSD de Tukey, comparado ao controle (CTL).

Em seguida, o comportamento dos animais foi testado através do teste de LCE. Os dados obtidos com a avaliação do 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), são apresentados na tabela 13 e os valores apresentam a média ± erro padrão. Os animais IR8d jovens e adultos permaneceram significativamente menos tempo em braços fechados ($P < 0,01$) do que os animais do grupo CTL. Em relação ao número de entradas em braços abertos, os ratos jovens IR8d entraram significativamente mais vezes do que os ratos CTL ($P < 0,01$) enquanto os ratos adultos IR8d entraram significativamente ($P < 0,01$) menos vezes nos braços abertos do que os animais CTL. Os animais IR15d apresentaram diferenças significativas ($P < 0,01$) em relação ao grupo controle apenas no número de entradas nos braços fechados. Dados relevantes foram obtidos nesse teste através do número de quedas de animais dos braços abertos do dispositivo de testes: nenhum animal jovem caiu, um animal adulto do grupo IR15d, um animal adulto do grupo CTL e oito animais adultos do grupo IR8d caíram. Os parâmetros de medição obtidos para animais que caíram foram descontados em todos os testes de adultos.

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).

		Jovens			Adultos		
Tratamento		CTL (n=48)	IR8d (n=48)	IR15d (n=48)	CTL (n=47)	IR8d (n=40)	IR15d (n=47)
Braços Abertos	Número de entradas	12,4 ± 0,5	17,7 ± 0,5**	12,6 ± 0,3	10,5 ± 0,3	7,6 ± 0,4**	6,3 ± 0,4**
	Tempo gasto (s)	121,3 ± 3,5	152,3 ± 2,3**	122,7 ± 1,7	102,4 ± 2,1	183,2 ± 3,6**	92,3 ± 3,9
Braços Fechados	Número de entradas	11,2 ± 0,3	12,1 ± 0,3	11,2 ± 0,2	7,5 ± 0,3	6,8 ± 0,3	8,3 ± 0,3
	Tempo gasto (s)	113,5 ± 5,3	80,8 ± 1,9**	120,7 ± 1,8	118,2 ± 2,9	94,5 ± 3,0**	120,1 ± 3,1

**** $P < 0.01$, ANOVA seguido de teste HSD de Tukey, comparado ao controle (CTL).**

Uma maneira complementar de avaliar os dados do teste de LCE é através da comparação da porcentagem do tempo gasto pelos animais nos braços abertos, a porcentagem de entradas nos braços abertos e o número total de entradas em todos os braços ⁷⁶. As 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) estão apresentados na tabela 14, os valores apresentam a média.

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).

Tratamento	Jovens			Adultos		
	CTL (n=48)	IR8d (n=48)	IR15d (n=48)	CTL (n=47)	IR8d (n=40)	IR15d (n=47)
% tempo gasto em braços abertos	51,7	65,3	50,4	46,4	66,0	43,5
% entradas em braços abertos	52,5	59,4	52,9	58,3	52,8	43,2
Número total de entradas em braços	23,6	29,8	23,8	18,0	14,4	14,6

Finalmente, foi avaliado o comportamento dos animais no teste de HB. Os animais IR8d jovens e adultos tiveram o número de enfiadas de cabeça significativamente menor ($P < 0,05$ para animais jovens e $P < 0,01$ para adultos) que os animais do grupo controle, enquanto o número de enfiadas de patas foi significativamente maior ($P < 0,01$) para os IR8d em relação ao CTL. Animais jovens do grupo IR15d não apresentaram alterações no teste de HB quando comparados aos animais de controle, porém, quando adultos tiveram o número de enfiadas de cabeça e de patas significativamente maior ($P < 0,05$) quando comparados aos animais do grupo controle. Os dados de comportamento no teste de *Hole Board* 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) estão dispostos na tabela 15, os valores apresentam a média $\pm$ erro padrão.

Tabela 15: Comportamento no teste de *Hole Board* 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).

	Parâmetro comportamental	CTL (n=48)	IR8d (n=48)	IR15d (n=48)
Jovens	Número de enfiadas de cabeça	15,5 ± 1,2	8,8 ± 0,3**	13,4 ± 0,4
	Número de enfiadas de patas	8,0 ± 0,4	11,4 ± 0,5**	9,4 ± 0,4
	Parâmetro comportamental	CTL (n=47)	IR8d (n=40)	IR15d (n=47)
Adultos	Número de enfiadas de cabeça	4,2 ± 0,4	2,6 ± 0,2*	5,6 ± 0,4*
	Número de enfiadas de patas	1,8 ± 0,2	3,7 ± 0,3**	2,6 ± 0,2*

* $P < 0.05$, ANOVA seguido de teste HSD de Tukey, comparado ao controle (CTL).

** $P < 0.01$, ANOVA seguido de teste HSD de Tukey, comparado ao controle (CTL).

5. Discussão

5.1 Efeitos da irradiação nas fêmeas F0

Nenhum efeito foi observado para as ratas F0; não houve alteração no número de animais nascidos, na duração da gestação e no peso. O padrão de formação de ninhinhos não pode ser relacionado a outros trabalhos, entretanto, estudos futuros poderão esclarecer melhor esse aspecto.

5.2 Peso corporal pós-natal em animais expostos

Trabalhos que analisam os efeitos causados pela exposição a baixas doses de radiação ionizante durante a gestação de animais geralmente utilizam doses superiores às

doses utilizadas em procedimentos diagnósticos humanos ¹⁴, portanto, este estudo corrobora a busca por efeitos em doses baixas. Os pesos corpóreos dos animais F1 irradiados e controle não diferiram estatisticamente até a idade de 70 dias, no entanto, a partir dessa idade o ganho de peso dos animais irradiados foi menor que o dos animais de controle. Esse fato é interessante porque caso ocorra programação fetal em resposta a estresses, como a desnutrição, o resultado é um menor peso no nascimento dos animais, já que a capacidade metabólica no útero diminui, e após o nascimento, na ausência de estresse, o metabolismo animal tende a aumentar como resposta compensatória ^{5, 77}. No entanto, os dados obtidos sugerem que as baixas doses de radiação ionizante produzem um efeito diferente, já que ocorre a diminuição de ganho de peso na fase adulta. A diferença no peso corpóreo médio aos 70 dias de idade em relação ao grupo controle foi de 13,57% para IR8d e 7,47% para IR15d, aos 90 dias de idade a diferença foi de 13,06% para IR8d e 7,01% para IR15d. Em estudos relacionados ao estresse crônico de intensidade leve [em inglês, *Chronic Mild Stress (CMS)*] os animais que são expostos a uma condição ambiental crônica estressante e moderada podem ter o ganho de massa reduzido ^{78, 79}. Os ratos desse trabalho apresentaram comportamento alterado de ansiedade e a perda de ganho de massa pode estar relacionada a essa alteração. Os estudos de Jensch *et al.* ^{80, 81} utilizando ratos irradiados com doses variando de 100 a 400 mGy nos dias gestacionais 9 e 17 não resultaram em alterações significativas do desempenho comportamental de animais adultos, entretanto, um déficit de crescimento apareceu na idade jovem persistindo na idade adulta.

5.3 Desenvolvimento neurológico e motor de recém-nascidos

As anormalidades causadas no Sistema Nervoso Central (SNC) pelas radiações ionizantes parecem ser diversas em estudos de baixas doses; o trabalho de Jensch e Brent ⁸⁰ sobre o desenvolvimento neurofisiológico usando ratos Wistar irradiados com dose de 200 mGy no dia gestacional 17 não apresenta diferença significativa no teste de abertura dos olhos. Entretanto, no presente trabalho, os animais do grupo IR8d atrasaram a resposta do reflexo de abertura dos olhos e o tempo para primeira virada no teste de geotaxia negativa em comparação aos animais do grupo controle. Esses dados indicam comprometimento do desenvolvimento sensório-motor e atraso na responsividade do

sistema nervoso em recém-nascidos irradiados, especialmente para animais irradiados no 8º dia de gestação.

5.4 Transtornos comportamentais em animais expostos

O indivíduo ansioso não é sempre ansioso, porém é ansioso mais frequentemente que os outros, apresentando comportamento desproporcional a estímulos, conseqüentemente, a melhor maneira de se avaliar transtornos de ansiedade é medindo a frequência e a intensidade em que esse indivíduo exibe estados ansiosos ⁶³. Através do procedimento de testes sequenciais adotado nesse trabalho fortes evidências experimentais mostram que, mesmo para a dose única de 15 mGy durante o desenvolvimento intrauterino de ratos Wistar, há uma diminuição na função do Sistema Nervoso Central. Como esperado, os efeitos no desenvolvimento e comportamento dos animais que sofreram exposição intrauterina aos raios X variam dependendo da idade gestacional em que ocorreu a irradiação. Nos estudos com roedores, a emotividade e a exploração estão inversamente relacionadas, uma vez que a alta emocionalidade inibe a exploração, enquanto a baixa emocionalidade facilita ⁶⁸. Os resultados obtidos nos testes de ACA, LCE e HB são consistentes em demonstrar que há efeitos deletérios relacionados à ansiedade de animais expostos durante o desenvolvimento intrauterino.

Os resultados do teste de ACA sugerem que as baixas doses de radiação ionizante modificam os comportamentos relacionados a ansiedade em ratos, especialmente para os expostos no 8º dia de gestação. Comparando a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos ratos jovens IR8d com os animais do grupo controle houve um aumento que indica excitabilidade. Ratos jovens IR15d, por outro lado, apresentaram menor comportamento exploratório que os ratos jovens CTL. É esperado que tanto a atividade locomotora quanto a exploração diminuam com a idade, já que os animais mais velhos apresentam níveis de ansiedade menores. A pesquisa de Minamisawa e Hirokaga ⁸² relata uma diminuição de alterações comportamentais ao longo da vida adulta; essa pesquisa utilizou camundongos expostos a 100 mGy de raios γ durante o DG 14 que sofreram alterações comportamentais mais notáveis quando jovens se comparados ao grupo controle. Como esperado, os ratos IR8d adultos apresentaram menor atividade locomotora quando comparados aos jovens IR8d e, de maneira interessante, notou-se que

os ratos IR8d adultos apresentaram menor atividade locomotora quando comparados aos ratos adultos do grupo controle, indicando um comportamento normo-ansioso. O comportamento exploratório de animais adultos IR8d foi menor que o de IR8d jovens, mas maior que o de animais adultos CTL. Animais adultos IR15d apresentaram a esperada diminuição de atividade locomotora e exploração com a idade, mas também apresentaram diminuição na deambulação quando comparados aos animais adultos do grupo CTL.

Os resultados do teste de LCE também indicaram que os animais jovens IR8d apresentaram excitabilidade quando comparados aos animais do grupo CTL, enquanto os IR15d não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo CTL. Como esperado, os animais adultos tiveram diminuídas a atividade locomotora e a exploração comparadas aos jovens. Para adultos, foi marcante que os IR8d tiveram uma grande queda nos valores de ambulância (número total de entradas em braços) e um grande número de animais que caíram do dispositivo em relação ao grupo CTL, provavelmente devido ao comprometimento da coordenação motora. Os animais adultos IR15d apresentaram menor número de entradas nos braços abertos, indicando uma alta ansiedade. É necessário analisar o conjunto de todos os dados obtidos no teste de LCE porque o número de entradas em ambos os braços não deve ser considerado o único indicador de ansiedade alterada, o aumento de entradas pode ser influenciado pelo aumento das atividades locomotoras e exploratórias ⁸³.

No teste HB, a enfiada de cabeça está correlacionada com a atividade exploratória. De acordo com Adzu *et al.* ⁸⁴, a diminuição da atividade exploratória indicada por um menor número de enfiadas de cabeça é uma medida da depressão da atividade do SNC, enquanto um maior número de enfiadas de cabeça sugere alta estimulação da atividade do SNC. A enfiada de patas está correlacionada com a coordenação motora, portanto os animais com maior número de enfiadas de patas têm comprometimento da coordenação motora. No presente estudo, os dados dos animais IR8d jovens e adultos sugerem comprometimento da coordenação motora e do SNC; já que os animais exploraram menos o dispositivo ao passo que tiveram um maior número de enfiadas de patas que os animais do grupo CTL – corroborando com os dados, principalmente o número de quedas, do teste de LCE. Os dados dos animais do grupo IR15d jovens não apresentam diferença em relação ao grupo controle, para os animais adultos do grupo IR15d não se pode confirmar

comprometimento de coordenação motora em relação ao grupo controle porque há um número aumentado de exploração que pode levar ao maior número de enfiadas de patas.

O uso de uma combinação de testes permite uma observação mais precisa da ansiedade do animal. Os dados obtidos pelos testes de ACA, LCE e HB se sustentam, sugerindo um aumento no comportamento exploratório e uma diminuição na ansiedade geral dos animais do grupo IR8d com 30 dias de idade; entretanto, ocorre o oposto quando examinados aos 70 dias de idade. Nenhum efeito foi observado nos animais do grupo IR15d quando testados com 30 dias de idade, havendo aumento da ansiedade aos 70 dias de idade. Os testes de LCE e HB também demonstraram um comprometimento da coordenação motora em animais irradiados, especialmente para animais IR8d.

5.5 Efeitos da irradiação intrauterina em ratos Wistar

No presente estudo, após a irradiação com baixas doses de radiação ionizante em dois estágios diferentes do desenvolvimento intrauterino de ratos Wistar (IR8d e IR15d), representando, respectivamente, o início e o fim da fase organogênese (sabidamente a mais radiosensível), foram analisados os efeitos comportamentais na prole e nas mães. Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito na literatura em relação ao aumento de efeitos deletérios quando a irradiação ocorre no início da organogênese, sendo esse, o estágio de desenvolvimento fetal com maior radiosensibilidade. O trabalho de Baskar e Devi ⁸⁵ mostra que a exposição intrauterina de camundongos durante a organogênese e início do período fetal (DG 11,5; DG 12,5 e DG 14,5), com 350 mGy, diminuiu significativamente o comportamento exploratório e locomoção em camundongos adultos; sendo que os animais expostos no DG 11,5 apresentaram maior radiosensibilidade. O trabalho de Werboff *et al.* ⁸⁶ apresenta diminuição significativa da atividade locomotora de ratos com 55 dias de idade que foram irradiados no DG10 com dose de 220 mGy (raios X), no entanto, esse efeito não foi detectado em animais irradiados no DG15 que, de maneira oposta, tiveram um aumento do nível de atividade locomotora em comparação com os animais não irradiados. Nesse mesmo trabalho de Werboff *et al.* ⁸⁶ também foi demonstrado que a irradiação de corpo inteiro de ratas prenhas pode gerar depressão da atividade da prole no tempo de primeira virada (teste de geotaxia negativa) para animais expostos à dose de 220 mGy no DG15.

Embora existam poucos dados disponíveis sobre os efeitos comportamentais da exposição intrauterina em ratos, é sugerido que não há efeitos observáveis para doses abaixo de 50 mGy ^{5, 14, 15}. O limiar para efeitos deletérios comportamentais detectáveis descrito na literatura seria para um valor de dose entre 100 a 300 mGy, esse limite foi estabelecido em um trabalho de Wang e Zhou ⁸⁷ com base no estudo realizado com camundongos irradiados com radiação beta de água tritiada (HTO). Vale ressaltar que os dias em que ocorrem os estágios de gestação de ratos e camundongos diferem, a pré-implantação em camundongos ocorre nos primeiros 5 dias de gestação, a organogênese entre 8 e 15 dias e o desenvolvimento fetal entre os 14 e 20 dias de gestação ⁵. Os três principais estágios do desenvolvimento intrauterino em ratos Wistar são a pré-implantação, que ocorre durante os sete primeiros dias da gestação, a organogênese, entre os dias 8 e 15 de gestação e o desenvolvimento fetal, do dia 16 ao 22 da gestação.

A responsividade alterada do sistema nervoso pós-natal, observada principalmente em animais IR8d, se dá provavelmente devido ao efeito da exposição a baixas doses de radiação ionizante no início da organogênese. A diferenciação celular, que ocorre com bastante frequência na organogênese, amplia o processo em que células menos especializadas se tornam mais especializadas através da expressão de um conjunto específico de genes; há, então, uma cascata de sinalização celular em que o sinal inicial é amplificado. Segundo a Lei de Bergonie e Tribondeau a alta vascularização e a alta taxa de proliferação celular levam a uma maior radiosensibilidade, também, a radiosensibilidade é inversamente proporcional ao grau de diferenciação celular e diretamente proporcional ao número de divisões necessárias para a célula atingir sua forma; conseqüentemente, a organogênese é a fase do desenvolvimento embrionário em que há uma maior probabilidade de efeitos deletérios na prole.

Experimentos que investigam os efeitos de baixas doses em animais geralmente utilizam doses superiores às utilizadas em procedimentos de diagnóstico humano ¹⁴; assim, o presente estudo corrobora com a busca de efeitos para doses de radiodiagnóstico. É importante ressaltar que, mesmo para a exposição intrauterina de 15 mGy, houve efeitos notáveis na prole, em especial para os animais irradiados no DG8: redução do ganho de peso quando adulto, comprometimento da coordenação motora e comportamento de exploração afetado. Os efeitos observados nos animais do grupo IR15d foram mais brandos quando comparados ao grupo CTL, mas apresentaram alterações na emocionalidade dos animais ⁸⁸. Uma hipótese crível é que a exposição intrauterina a 15

mGy tenha levado à programação fetal. A programação fetal ocorre quando parâmetros fisiológicos importantes são redefinidos durante o desenvolvimento intrauterino pela influência de eventos externos, como o estresse oxidativo induzido pela exposição as radiações ionizantes ⁸⁹. O conceito “desenvolvimento de origens de saúde e doença” (do inglês *Developmental Origins of Health and Disease* - DOHaD) sugere que padrões epigenéticos poderiam explicar a ocorrência de programação fetal induzida pelas baixas doses de radiação ionizante afetando a responsividade do sistema nervoso pós-natal em animais do grupo IR8d ⁹⁰.

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., Prinzie, R.D., Prinzie, 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. & Cunningham, 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/IAEABooks/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 nuchal 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 F.H. *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) Snowden, 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., Jensh, 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) Walf, 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):e5343.(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, Lucía 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).

Low-dose ionizing radiation exposure during pregnancy induces behavioral impairment and lower weight gain in adult rats

GIAROLA, R.S.^{1*}; ALMEIDA, G.H.O.¹; HUNGARO, T.H.¹; DE PAULA, I.R.¹; GODINHO, A.F.²; ACENCIO, M.L.³; MESA, J.^{1,4}; LEMKE, N.¹; VIEIRA L.D.¹; DELICIO, H.C.⁴

¹Department of Physics and Biophysics, Bioscience Institute, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

²Center for Toxicological Assessment (CEATOX), Bioscience Institute, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

³Department of Clinical and Molecular Medicine, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway.

⁴Department of Physiology, Bioscience Institute, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

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 mothers. 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 statistically significant 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.

Introduction

It is widely accepted that ionizing forms of diagnostic imaging should not be used in pregnant women due to the potential harmful biological effects of ionizing radiation (IR) on the embryo and fetus ¹. The IR can produce direct ionization in the DNA affecting its functionality or even destroying the DNA, IR can also produce indirect effects by the energy deposited in a biological environment and then trigger the production of reactive free radicals which, in turn, increase cellular oxidative stress ¹. Oxidative stress may cause cellular phenotypic changes that can predispose the fetus to certain post-natal phenotypes ², negative effects are usually expected due to IR-induced oxidative stress ³. Therefore, to avoid these possible negative effects, it is preferable not to expose embryo and fetus tissues to IR. However, ionizing radiation induce negative effects at all exposure levels in humans?

While the biological effects associated with prenatal exposure to high-dose ($> 100\text{mGy}$) ionizing radiation in humans have been widely investigated ⁴, studies reporting the biological effects of low-dose ($\leq 100\text{ mGy}$) ionizing radiation (LDIR) are scarce and the interpretation of its results is often controversial ^{1,5-10}. A pioneering study of childhood cancers following irradiation during fetal life was conducted by Dr. Alice Stewart in 1956 ^{7,10}. This first report inspired further research to conduct studies aiming to establish a strong correlation between LDIR from diagnostic imaging procedures during pregnancy and adverse health effects on growth and development. For example, D'ippolito and Bitelli ¹ reported that exposure to radiation doses below 50 mGy is not associated with increased risk of miscarriage, congenital anomalies, mental retardation or neonatal mortality. In addition, Cohen *et al.* ¹¹ studying pregnant women exposed to radiographic diagnostic procedures during pregnancy, showed that the rate of live births and miscarriages was, respectively, higher and lower in the low-dose group ($< 1.0\text{ mGy}$ during pregnancy). In addition, they argued that ionizing radiation has its effect directly on the fetus, differing from drugs, so there are no concerns about differences in metabolism, absorption, or placental transfer between the animal and the human model. However, the Cohen *et al.* report concludes that the threshold for effects such as growth retardation and teratogenesis is 200 mGy ¹¹, while National Council on Radiation Report (NCRP) No. 174 established the threshold level of 50 mGy ¹². No solid correlation could be established from the available literature that LDIR results in an increased risk of stochastic and deterministic effects to the offspring ^{5,8}. Therefore, there is no currently solid evidence based on well-controlled studies that LDIR induces deleterious effects in humans.

As it is not possible to perform controlled experiments to investigate the effects of LDIR in humans for ethical and moral reasons, model organisms, such as rats, should be used instead. Rodent models allow precise manipulation of all influencing factors ⁵ and provide fundamental biological and behavioral data. Furthermore, due to its high reproductive rate, rapid body development, easy manipulation, good learning ability, and a shorter life span compared to humans, it is possible to investigate long-term effects ⁵. The correspondence between the embryonic stages of rat and human is described by Hill ¹³, making it possible to carry the observations made in rats to the human in relation to the irradiation period.

Exposure to LDIR during pregnancy can lead to behavioral alterations, and animals exposed in utero may exhibit behavioral changes during maturation ¹⁴. Some studies recognize brain damage in the post-natal period ¹⁵, the available literature describes harmful effects on the developing cerebral cortex and altered post-natal behavior ^{6,16}. Several studies have been conducted on the irradiation of pregnant rats, but generally, the radiodiagnostic range ($<50\text{ mGy}$) is not related to the increased risk of congenital anomalies ^{17,18}. De Santis *et al.* ¹⁷ discuss that doses used in animal studies are generally higher than doses used in diagnostic procedures in humans, therefore, the present study aims to search for effects at low-doses. Behavioral tests and neurodevelopmental reflexes are tools for determining changes that could have been caused by brain injury, and abnormalities in the development of the offspring ¹⁹. Otake *et al.* reported that children exposed in utero to the Hiroshima atomic bomb were clinically identified to be mentally retarded with reduced intelligence quotient (IQ) scores ^{8,20}.

The experimental models of behavioral assessment selected in the present study are widely used in risk assessment and evidence damage to the central nervous system. Rodents, such as the Wistar rat, exhibit a natural aversion to lighted areas and a characteristic behavior that leads them to remain close to vertical surfaces (thigmotaxis), these animals also tend to exploit the threatening stimuli (neophilia). The result of these conflicting impulses is anxiety. The decrease of anxiety leads to an increase in exploratory behavior and, in an antagonistic way, the increase of anxiety leads to lesser locomotion and the tendency to remain at the edges of the field ²¹. Thus, the tests allow evaluating the behavior of rats in relation to anxiety in terms of their abilities to acquire and use spatial information as well as habituation to exploratory activity over time.

We examined the effects of in utero ionizing radiation exposure on postnatal physiological, behavioral and locomotor outcomes in infant, young (30 days old) and adult (70 days old) Wistar rats. Pregnant Wistar were exposed to 15 mGy in two distinct stages of development: organogenesis (gestational day 8 [GD8], considered the onset of the organogenesis phase) and

fetal development (gestational day 15 [GD15], considered the end of organogenesis phase)¹⁵. The teratogenic effects of LDIR during organogenesis can lead to intrauterine growth restriction (IURG)¹⁷, such as lethal effects, malformations, structural alterations, mental retardation and cancer induction^{12,22}. As pregnancy has its inherently associated risks, it is difficult to measure the effects of LDIR during intrauterine exposure. Therefore, the present study was designed to avoid any external interference that could negatively influence pregnancy in rats.

Materials and Methods

Animals and breeding

Adult female (F0, 85 days of age, 150g, $n = 36$) and male (85 days of age, 230g, $n = 15$) virgin albino Wistar rats were obtained from breeding colony housed at the Sao Paulo State University (UNESP). Twenty days before the beginning of the experiment the rats were housed in groups of five in polypropylene cages (40 x 50 x 20 cm) at controlled room temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), on a 12 h light/dark cycle starting at 6 a.m., standard rat pellet chow (Presence®, Brazil) and tap water were available *ad libitum* during the whole experiment.

Matings were conducted during overnight, by placing a male breeder in female housing, on the next morning females were checked for evidence. Mating was confirmed by the presence of spermatozoa in the contents of the vaginal smear. After pregnancy confirmation, females were housed singly, and this moment was designated as gestational day 1 (GD1). All animals were weighed every three days.

Statement

All experiments and methods were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. This research agrees with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazil's National Council for the Control of Animal Experimentation. All procedures were approved by the Committee of Ethics on the Use of Animals (887/2016-CEUA), Institutional Ethical Committee of UNESP at Botucatu, Brazil.

Irradiation and postnatal follow-up

The pregnant rats were randomly divided into three experimental groups ($n = 36$): sham-irradiated control (CTL, $n = 12$), irradiated on the eighth day of pregnancy (IR8d, $n = 12$) and irradiated on the fifteenth day of pregnancy (IR15d, $n = 12$). The pregnant Wistar were whole-body irradiated in a circular lucite chamber with 15 mGy of X-rays, with a dose rate of 18 mGy per second, this value was defined because is it a low-dose value into diagnostic range that can be achieved in a single radiological exam and is within the reference dose levels adult abdomen exam²³.

The irradiation was performed by a Shimadzu EZy-Rad Radiodiagnostic machine operating at 81 kVp and 110 mAs, with single 1.2 mm focus, 1.5 mm Al of permanent filtration plus 1.0 mm Al collimator filtration (focus tissue distance = 83 cm). The sham-irradiated control group underwent a similar experimental procedure to those irradiated, except that the machine was turned off. A calibrated Radcal Corporation ionization chamber (model 90x5-6) connected to a Radcal Corporation electrometer (model 9010) was used to determine the dose delivery parameters (15 mGy), the equipment was placed inside the circular lucite chamber at the central position where the rats were irradiated. After a whole-body single-dose exposure to X-rays, the F0 body weights were measured every three days until the birth of the offspring.

Dams were allowed to give birth and nurture their offspring (F1) normally, and on the day after delivery all the litters were examined externally and sexed. Litters were culled to four males in each litter on post-natal day 3²⁴. Weaning was performed when animals were 21 days old. All animals were marked twice a week with colored pens to track all the physical and behavioral

developmental evaluations. F1 animals were weighed individually every two days from postnatal day 1 to day 91.

Assessment of reflex development and physiological and behavioral responses

The reflex development was evaluated by eye-opening and negative geotaxis tests in infant rats. The physiological response evaluated in the present study was weight gain. The anxiety-related behavior responses were evaluated by open field, elevated plus maze and hole board tests. Rat behavioral evaluations were performed, firstly at a young age, with 30 days of life, and secondly at an adult age, with 70 days of life, using open field, elevated plus maze and hole board tests. Animals were tested without prior habituation in order to avoid adaptation since these tests should capture the natural conflict between the exploration and the tendency to avoid new environments and behavioral responses can only be observed before habituation occurs ^{25,26}. The experiments were conducted between May 2016 and January 2017.

Eye-opening test

Eye-opening (EO) test indicates abnormalities in neurodevelopmental reflex in neonatal rodents. All pups were checked daily since birth, and the number of days that the four pups of the same litter opened their eyes was considered ¹⁹.

Negative geotaxis test

Negative geotaxis (NG) test is used for sensorimotor development during the early days of post-natal development. Beginning on day 3 after the birth, the pups were individually positioned face down on a 45° inclined surface ramp and the time required for the pup to rotate at least 90°, not exceeding 60 seconds per trial, was recorded. Animals that were unable to perform the task were counted as unrealized until they were able. The first climb was considered the number of days in which all the pups of the same litter in each group turned around at least 90° ²⁶.

Behavioral tests

General considerations and experimental conditions

The room for behavioral assessment was sound-proof, temperature-controlled and illuminated by dim red lights. The period of behavioral observations was defined between 9 a.m. and 11 a.m. The animals were submitted to three behavioral tests to indicate anxiety, in the following order and sequentially: the open field (OF), elevated plus-maze (EPM) and hole board (HB). All these tests indirectly measure anxiety by measuring exploratory and locomotor activities. We opted to perform the three tests to mitigate misinterpretation of the results obtained by an individual test ^{28,29}. Usually, a combination of tests is used to improve the analysis of the animal's anxiety, as it is a transient condition that is only noticed at given moment ²⁶. All the behavioral tests were performed on the same day, during two phases: when the animals were 30 and 70 days of age, all pups in each litter (F1 animals) underwent the subsequential behavioral tests. Animals that fell on the elevated plus-maze test had their data disregarded for further analysis, but the number of falls was counted. To prevent observational bias in behavioral assessment, the three testers were blind to the treatment group. The apparatus used was thoroughly cleaned with a 5% ethanol solution before each animal was introduced. The maximum care in handling was taken to not influence the responses obtained, the animals were familiarized with manipulation of the handlers. The proper handling may avoid changes of mood, discomfort, and increasing excitation, factors that may influence the outcomes, including rearing behavior ³⁰.

Open field test

The open field (OF) test is an experiment used to analyze the levels of general locomotor activity, emotionality and exploratory behavior in rodents used for scientific research ³¹. The test device

consists of a round wooden arena (100 cm in diameter) surrounded by walls (32 cm high walls) that prevent the animal from escaping. The round area is demarcated by painted black stripes into three concentric circles: central, medium and external (diameters of 18, 57 and 100 cm, respectively), and there are also subdivision quadrants painted in which circle: 6, 6 and 12, respectively, these demarcations serve to account for the movement of the animal. The tested animal is subjected to an unknown new environment from which it is not able to escape.

During open field observations, each rat was individually placed in the center of the arena and for the next three minutes, the rat movements were recorded by a camera mounted above the arena. Through the analysis of the recorded videos, locomotor activity (number of demarcated spaces that the animal entered with the four paws), rearing (the frequency animals rise up on its hind limbs), time spent to cross the center for the first time (the time spent for the first time that the animal crossed the center circle of the arena), and the number of crossings by the arena central circle (number of times that the animal crossed the arena center) were counted.

Elevated plus-maze test

The elevated plus-maze (EPM) is a test used to investigate rodent anxiety³². The apparatus consists of two open arms crossed with two closed arms of equal length and width (50 x 10 cm each) and the center – the place where the arms join (10 x 10 cm). The EPM is 50 cm elevated above the floor and the open arms have a plexiglass edge 1 cm high while the enclosed arms have wooden walls that extend 40 cm high. This test is based on the principle that the rat can freely explore the open arms but may also remain protected (thigmotaxis) in the closed arms, normally rats tend to avoid open areas. This conflict allows to measure anxiety or fear-induced decrease in normal exploratory activity; in addition, the number of entries in both arms is used as a measure of locomotor activity and exploratory behavior³³. Anxiolytic drugs led the rats to spend more time on open arms, while anxiogenic does the opposite³⁴.

Each animal was individually placed in the center of the EPM facing a closed arm and allowed to explore freely for five minutes. Total entries with all the paws and the time that each animal spent exploring (seconds) were counted through the analysis of recorded videos using a camera mounted above the apparatus³⁵. Sometimes animals can fall off the device's open arms, although it is not common to happen. We recorded these events, but we disregarded them for further analyses because the anxiety levels of animals that experienced falls were likely to be affected, and therefore the results of the following test, the hole board test, for these animals could not be reliable³⁶.

Hole Board

The Hole Board (HB) test is an experimental method that measures anxiety, exploratory behavior, and locomotor activity. The device is a square wooden arena with 57 cm of edges (floor) and a surrounding wall of 30 cm high, the floor has 81 (9 x 9) round holes (2.5 cm diameter) distributed throughout the floor and separated from each other by 3.5 cm³⁷. The rats were individually placed in the center of the apparatus and, for the next 5 minutes, the movement was recorded by a camera placed under the device. During the test the rats could move freely. The number of head and legs dip were counted. The rat's curiosity causes it to poke his nose into a hole, so the head dip was only considered when both eyes were in the low level of the hole. The leg dip was only counted when all the fingers passed through the hole³⁸.

Statistical analysis

To determine the significance of physiological and behavioral differences between the irradiated and control groups, we used One-way Analysis of Variance (ANOVA) in conjunction with

Tukey's honestly significant difference (HSD) post-hoc. All statistical analyzes were performed using the STATISTICA software ³⁹. Results were considered significant at p -values < 0.05 .

Results

Postnatal development of animal weight

In our study, following irradiation with 15 mGy of X-ray on gestational days 8 and 15, pregnant rats gained weight normally and their weights were not significantly different from pregnant rats in the unirradiated control (Table 1). Pregnancy duration and litter size were also not significantly different between irradiated and control groups ($P > 0.7$ for pregnancy duration and $P > 0.3$ for litter size). Moreover, mortality was not observed in any group.

There was no significant difference between the irradiated and control pups body weights (F1 animals at 96 hours of age) ($P > 0.75$) and between body weights of irradiated and control F1 animals aged 30 days; however, body weights of F1 animals aged 70 to 91 were significantly different ($P < 0.05$) between control and irradiated animals (irradiated on gestational days 8 [IR8d] and 15 [IR15d]) (Table 2). IR8d and IR15d rats had lower weight gain when compared to control (Table 2).

Early sensorimotor development is impaired by in utero LDIR

To check whether prenatal LDIR was able to permanently alter the responsiveness of the postnatal nervous system, we first assessed the early sensorimotor development. To this end, the results obtained by the eye-opening and negative geotaxis tests were analyzed.

In the eye-opening test, we evaluated the mean number of days each group opened their eyes after birth. IR8d animals, but not IR15d animals, delayed eye-opening significantly in relation to CTL animals (Table 3; $P < 0.01$). This was the first indicative factor that prenatal irradiation, specifically on GD8, could impair sensorimotor development and prenatal nervous system responsiveness.

In the negative geotaxis test, we analyzed the mean number of days each group performed its first climb after birth. We observed that IR8d and IR15d animals made their first climbs significantly later ($P < 0.05$) than CTL animals (Table 3). Markedly, IR8d animals presented higher latency for the first climb. However, the mean time to climb did not present statistical difference.

In utero LDIR at gestation day 8 generates anxiety in rats

The impairment of sensorimotor development by in utero LDIR, especially LDIR on the GD8, is an evidence that postnatal nervous system responsiveness is altered due to prenatal LDIR. To reinforce this, we sought to investigate whether prenatal exposure to LDIR could also generate postnatal anxiety.

We firstly performed the OF test and four behavioral parameters were analyzed: the number of squares crossed, rearing frequency, time to first cross the center and number of crossings by the center – indicators of locomotor and exploratory activities ⁴⁰. The number of squares crossed by young IR8d rats (30 days old rats) was significantly higher than the crossed by young CTL rats ($P < 0.01$) and no significant difference could be detected when comparing young IR15d rats to CTL ones, summarized in Table 4. For adult rats (70 days old), on the other hand, the number of squares crossed by IR8d and IR15d rats were significantly lower ($P < 0.01$) than those crossed by adult CTL rats of the same age. The rearing frequency was also significantly different between the irradiated groups and the control group: IR8d animals presented a higher rearing frequency than the control group ($P < 0.01$) and, contrarily, IR15d animals had a lower rearing behavior than the control group ($P < 0.01$) (Table 4). Regarding the time to first cross the center and the

number of crossings by the center, there were no statistically significant differences for both adults and young rats when we compared irradiated with sham-irradiated control animals (Table 4), suggesting that these two parameters did not detect changes in exploratory activities in the present study.

We evaluated next anxiety by the EPM test ³². In this test, high number of entries in closed arms associated with a long time spent in these arms indicate anxiety ²⁸. The evaluation of the EPM test is summarized for irradiated and sham-irradiated control young and adult rats in Table 5. Young IR8d animals entered on the open arms significantly more times than CTL mice ($P < 0.01$) while adult IR8d rats entered significantly ($P < 0.01$) less times than CTL animals. Regarding the number of entries into open arms, young IR8d rats entered significantly more times into open arms than CTL rats ($P < 0.01$) and adults IR8d rats entered statistically significant fewer times into open arms than CTL animals (Table 5). When we compare the number of entries into closed arms, we can observe significant differences ($P < 0.01$) only for adult IR15d rats: these animals entered significantly fewer times into closed arms than CTL animals (Table 5). Relevant data were obtained with the number of animals that fell off the device's open arms, none of the young animals fell off the open arms, while for adult control and IR15d one animal fell off for each group, and IR8d eight animals fell off from open arms. Another way to assess the data of EPM test is by calculating the percentage of time on open arms, percentage of entries in open arms and the total number of entries in both arms, this data is shown in Table 6 ³⁴.

Finally, we also evaluated anxiety-related behavior using the HB test, as shown in Table 7. For the young and adult IR8d animals, the number of head dips was significantly lower ($P < 0.01$ for adult and $P < 0.05$ for young animals) than that for CTL animals, while the number of leg dips was significantly higher ($P < 0.01$) (Table 7). Young IR15d animals showed no alterations in the HB test when compared to CTL animals, but the numbers of head and leg dips in adult IR15d animals were significantly higher ($P < 0.05$) than in control animals (Table 7).

Discussion

Physiological development of the animal

In our study, body weights of irradiated and control F1 were not statistically different until the postnatal age 70; however, from that age decreased relative to controls. This is interesting because fetal programming due to stress response, such as undernutrition, results in lower birth weight because the metabolic capacity in the uterus decrease, followed by a catch up growth and increase weight gain as adults as a compensatory response ^{5, 41}. Our data, however, suggest that LDIR induces a different outcome as the body weight decrease happens only at adult age. At age of 70 days, the difference in mean body weight in relation to CTL group was IR8d = 13.57% and IR15d = 7.47%. At age of 90 days, the difference remained almost the same value: IR8d = 13.06% and IR15d = 7.01%. In several studies related to chronic mild stress (CMS), in which animals are exposed to a chronic and moderate stressful environmental condition, the body weight gain in adult life is reduced ^{42,43}. The rats of our study presented anxiety behavior and this characteristic body weight loss might be related to the animal's stress level. For ionizing radiation, Jensh *et al.* ^{44,45} researches using Wistar adult rats irradiated at doses ranging from 100 to 400 mGy on the GD9 or GD17 did not result in significant alterations in adult behavioral performance, and both Jensh's studies and our growth retardation persists postnatally.

Newborn Reflexes and early motor development impairment

Abnormalities on the central nervous system (CNS) appear to be diverse on LDIR studies, Jensh and Brent ⁴⁴ neurophysiologic development study using Wistar rats irradiated with 200 mGy dose on the GD17 dose reported no significant difference in eye-opening test. However, in our study IR8d animals delayed the reflex response of eye-opening and the first climb on the negative geotaxis test compared to CTL animals, IR15d only delayed the first climb in relation to CTL.

Our data indicate impairment in sensorimotor development and prenatal nervous system responsiveness, especially for IR8d animals.

Behavioral disorders in exposed animals

An anxious individual is not always anxious but is anxious more often than others, presenting disproportionate behavior to a stimulus, consequently, the best way to assess anxiety is by measuring how often and how intensely he exhibits anxious states ²⁶. In our study, through a sequence of tests, strong experimental evidence shows that even for 15 mGy exposure during pregnancy there is a decrease in central nervous system function. As expected, the effects of X-ray irradiation exposure in utero on rat development and behavior varied depending on gestational age at which irradiation occurred. In rodent studies ⁴⁶, emotionality (or fear) and exploitation are inversely related since high emotionality inhibits exploration and low emotionality facilitates it. The results obtained from OF, HB and EPM tests are consistent in showing that there are deleterious effects related to the anxiety of the exposed animals.

The OF test results suggest that the prenatal LDIR modifies anxiety-related behaviors, especially in rats exposed during GD8. In comparison to young CTL animals, locomotor activity and exploratory behavior were higher in young IR8d rats, indicating excitability. Young IR15d rats, on the other hand, presented lower exploratory behavior than young CTL rats. Both locomotor activity and exploration are expected to decrease with age, as older animals present lower levels of anxiety, as well as in the present study, and it has been reported by Minamisawa and Hirokaga ⁴⁷ that mice exposed to 100 mGy of γ rays during 14th day of gestation results in behavioral effects, but these effects decrease at late adulthood, as irradiated adult rats presented less difference than irradiated young rats when compared to control. Adult IR8d animals presented lower locomotor activity when compared to young IR8d, which was expected. Interestingly they also presented a lower locomotor activity when compared to adult CTL, indicating a normo-anxious behavior. The exploratory behavior of adult IR8d animals was lower than in young IR8d animals but higher when compared to adult CTL animals. Adult IR15d animals presented the expected decrease in locomotor activity and exploration with age but also presented a decrease in ambulation frequency when compared to adult CTL.

Following OF tests, the EPM results also indicated that young IR8d animals presented excitability when compared to CTL group, while young IR15d did not present any statistical differences. As expected, adult animals had a decrease in locomotor activity and exploration, but also in EPM tests IR8d animals had a more pronounced drop in ambulation values and adult IR15d animals presented a lower number of entries in open arms, indicating a higher state of anxiety.

In the HB test head dip is correlated to exploratory activity and according to Adzu *et al.* ⁴⁸, the decrease in exploratory activity indicated by lower numbers of head dips is a measurement of depression of central nervous system (CNS) activity, whereas higher numbers of head dips suggest stimulation of CNS activity. Leg dip is correlated with motor coordination, therefore animals with a higher number of leg dips have motor coordination impairment. In the present study, young and adult IR8d data suggested depression on CNS and motor coordination impairment; as animals less exploited the device while presented a higher number of leg dip than CTL animals. The young IR15d animals did not present statistical difference to control group, adult IR15d data could not confirm motor coordination impairment in relation to control group because there is an increased exploration that can lead to the greater number of leg dip. A further intriguing aspect was the number of animal falls on the EPM test from the open arms of the device showing clear evidence of the motor coordination impairment of irradiated animals, especially IR8d.

The use of a combination of tests allows a more accurate observation of the animal's anxiety. The OF, EPM and HB generated data support each other, suggesting IR8d had higher exploratory behavior and decreased general anxiety when tested at 30 days old, however, the opposite occurs when examined at 70 days old. No effects were observed in the IR15d when tested at 30 days old,

with increased anxiety at 70 days old. The EPM and HB tests also demonstrated a motor coordination impairment in irradiated animals, especially for IR8d animals.

Final considerations

To the best of our knowledge there are no studies showing biological effects for doses below 100 mGy. According to Wang and Zhou ⁴⁹, the threshold for behavioral deleterious effects can only be detected from 100 mGy to 300 mGy, based on their study using mice irradiated with beta radiation from tritiated water (HTO). It is worth mentioning that gestation day stages of rat and mice differ, pre-implantation in mice occurs for the first 5 days of gestation, organogenesis between days 8 and 15 and fetal development between days 14 and 20 of gestation ⁵.

The three major stages of development in rats can be described as preimplantation, occurring during the first seven days of gestation, organogenesis, between days 8 and 15 of gestation, and fetal development, between days 16 and 22 of gestation. Therefore, the altered responsiveness of the postnatal nervous system observed mainly in IR8d animals is due to the effect of LDIR at the onset of organogenesis, when differentiation leads a process that less-specialized cells become more-specialized through the expression of a specific set of genes, by a cell signaling cascades, in which the initial signal is amplified. According to the “Law of Bergonie and Tribondeau” ⁵⁰ or “Radiosensitivity Law” the high vascularization and high cellular proliferation rate lead to greater radiosensitivity, also radiosensitivity is inversely proportional to the degree of cell differentiation and directly proportional to the number of divisions required for the cell to reach its shape, so organogenesis is the phase of embryonic development in which there is a greater probability of deleterious effects.

Animal experimentation that analyzes the effects of LDIR generally uses doses higher than those used in human diagnostic procedures ¹⁷, therefore, the present study corroborates the search for effects in low-doses. However, it is important to note that even for 15 mGy exposure during the GD8 effects were observed: reduction of the weight gain, motor coordination impairment and affected sense of exploration. We think that probably fetal programming occurred in the irradiated animals, the “development origins of health and disease” (DOHaD) concept suggests that epigenetic patterns could explain the occurrence of LDIR-induced fetal programming affecting the responsiveness of the postnatal nervous system in IR8d animals ⁵¹. The effects observed in IR15d animals were mild in relation to IR8d animals when compared to CTL group but showed affected emotionality without changing animal’s anxiety ⁵².

In the present study, two different stages (IR8d and IR15d) of development were used to analyze behavior effects caused by irradiation during pregnancy, and the results agree with those reported elsewhere regarding that the begging of fetal development is the more sensitivity stage. Baskar and Devi ⁵³ showed that 350 mGy mice exposure during organogenesis and early fetal period (11.5, 12.5, 14.5 days old) can decrease significantly locomotion and exploratory behavior in adult mice and, on day 11.5, embryos presented the highest radiosensitivity. Early studies of Werboff *et al.* ⁵⁴ presented a significant decrease in locomotor activity in rats aged 55 days old that were prenatally irradiated with 220 mGy X-rays exposure on gestational day 10. However, this effect was not detected in animals irradiated on the gestational day 15 that, oppositely, showed an activity level increased as compared to the non-irradiated animals. Werboff *et al.* ⁵⁴, also demonstrated that irradiation of whole-body pregnant rat can generate depression of activity in offspring first climb to animals exposed to 220 mGy dose in late gestation (day 15). On the other hand, although there is a limited literature data on behavioral effects of prenatal irradiation of rats, it is suggested that nonsignificant effects were observed at lower doses of 50 mGy ^{5,17,18}.

Our results present a piece of evidence that even lower doses led to lower weight gain when adults, impairments in the central nervous system since infant phase, behavioral changes as activity and emotionality alters, persisting later into life and altered motor coordination. Animals irradiated early in organogenesis presented adverse and more severe effects on irradiated animals at the end of organogenesis, however, both groups had weight gain reduction and permanent behavioral

changes evidencing fetal programming. We looked for following even lower doses than available data, as well as to use a considerable number of animals for a long time, in order to provide reliable data.

It is important to have more information about undesirable effects, further studies with low-doses are necessary to verify deleterious potential in human. Lack of information may lead to a misperception of the risk; therefore, an attempt should be made to increase and adopt effective radiation protection to low-doses, thus, information can help the radiologist to evaluate the best diagnostic procedure in a given clinical situation, ensuring the safety of the patient and the fetus.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Luis Carlos Vulcano of the School of Veterinary Medicine and Animal Science at Sao Paulo State University for kindly providing the X-ray equipment. Rodrigo Sanchez Giarola is a recipient of a fellowship from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (Brazil [CAPES]; www.capes.gov.br – Finance code 001). The funding body had no role in the design, analysis, interpretation of data, or in writing the manuscript.

References

- 1- D'IPPOLITO, G. & MEDEIROS, R.B. EXAMES RADIOLÓGICOS NA GESTAÇÃO. *RADIOL BRAS.* **38**, 447-450 (2005).
- 2- THOMPSON, L. & AL-HASAN, Y. IMPACT OF OXIDATIVE STRESS IN FETAL PROGRAMMING. *JOURNAL OF PREGNANCY* 2012, 1-8 (2012).
- 3- 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).
- 4- 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).
- 5- SREETHARAN, S. ET AL. IONIZING RADIATION EXPOSURE DURING PREGNANCY: EFFECTS ON POSTNATAL DEVELOPMENT AND LIFE. *RADIATION RESEARCH* 187, 647-658 (2017).
- 6- KRIEGLER, 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- COHEN-KEREM, R. ET AL. DIAGNOSTIC RADIATION IN PREGNANCY: PERCEPTION VERSUS TRUE RISKS. *J OBSTET GYNAECOL CAN.* 28, 43-48 (2006).
- 12- PRECONCEPTION AND PRENATAL RADIATION EXPOSURE: HEALTH EFFECTS AND PROTECTIVE GUIDANCE. REPORT NO.174. (NATIONAL COUNCIL ON RADIATION PROTECTION AND MEASUREMENTS, NCRP, 2013).
- 13- HILL, M.A. EMBRYOLOGY CARNEGIE STAGES. PREPRINT AT [HTTPS://EMBRYOLOGY.MED.UNSW.EDU.AU/EMBRYOLOGY/INDEX.PHP/CARNEGIE_STAGES](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie_Stages) (2018).
- 14- NORTON, S. SIGNIFICANCE OF SEX AND AGE DIFFERENCES. *ANIMAL MODELS IN PSYCHIATRY AND NEUROLOGY.* (MASER, J. & SELIGMAN, M.) 474 (PERGAMON PRESS, 1977).
- 15- KIMLER, B. & NORTON, S. BEHAVIORAL CHANGES AND STRUCTURAL DEFECTS IN RATS IRRADIATED IN UTERO. *INT J RADIAT ONCOL BIOL PHYS.* 15, 1171-1177 (1988).
- 16- SCHULL, W., NORTON, S., JENSH, R. IONIZING RADIATION AND THE DEVELOPING BRAIN. *NEUROTOXICOL TERATOL.* 12, 249-260 (1990).
- 17- DE SANTIS, M. ET AL. RADIATION EFFECTS ON DEVELOPMENT. *BIRTH DEFECTS RES C EMBRYO TODAY* 81, 177-182 (2007).
- 18- DE SANTIS, M. ET AL. IONIZING RADIATIONS IN PREGNANCY AND TERATOGENESIS: A REVIEW OF LITERATURE. *REPROD TOXICOL* 20, 323-329 (2005).
- 19- NGUYEN, A., ARMSTRONG, E. & YAGER, J. NEURODEVELOPMENTAL REFLEX TESTING IN NEONATAL RAT PUPS. *J VIS EXP* (2017). DOI:10.3791/55261.
- 20- OTAKE, M. & SCHULL, W. RADIATION-RELATED SMALL HEAD SIZES AMONG PRENATALLY EXPOSED A-BOMB SURVIVORS. *INT J RADIAT BIOL* 63, 255-270 (1993).
- 21- ENNACEUR, A. TESTS OF UNCONDITIONED ANXIETY – PITFALLS AND DISAPPOINTMENTS. *PHYSIOLOGY AND BEHAVIOUR* 135, 55-71 (2014).
- 22- BORRÁS, C. PROBLEMAS RADIODOSIMÉTRICOS EN LA APLICACIÓN DE RADIOSÓTOPOS A EMBRIOLOGIA 25 (SECRETARIADO DE PUBLICACIONES, 1974).
- 23- INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP). 1990 RECOMMENDATIONS OF THE INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. PUBLICATION 60, ANN. ICRP 21 (OXFORD: PERGAMON PRESS) (1991).
- 24- AGNISH, N. & KELLER, K. THE RATIONALE FOR CULLING OF RODENT LITTERS. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 38, 2-6 (1997).

Apêndice 1

- 25- 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 FAMACOGN.* 21, 1065-1076 (2011).
- 26- RAMOS, A. ANIMAL MODELS OF ANXIETY: DO I NEED MULTIPLE TESTS?. *TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES* 29, 493-498 (2008).
- 27- 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).
- 28- TERÇARIOL, P. & GODINHO, A. BEHAVIORAL EFFECTS OF ACUTE EXPOSURE TO THE INSECTICIDE FIPRONIL. *PESTIC BIOCHEM PHYSIOL.* 99, 221-225 (2011).
- 29- DURCAN, M. & LISTER, R. DOES DIRECTED EXPLORATION INFLUENCE LOCOMOTOR ACTIVITY IN A HOLEBOARD TEST. *BEHAV NEURAL BIOL.* 51, 121-125 (1989).
- 30- SZEGEDI, V. ET AL. TRANSIENT ALTERATIONS IN NEURONAL AND BEHAVIORAL ACTIVITY FOLLOWING BENSULTAP AND FIPRONIL TREATMENT IN RATS. *TOXICOLOGY* 214, 67-76 (2005).
- 31- SAMSON, A. ET AL. MOUSEMOVE: AN OPEN SOURCE PROGRAM FOR SEMI-AUTOMATED ANALYSIS OF MOVEMENT AND COGNITIVE TESTING IN RODENTS. *SCIENTIFIC REPORTS* 5, (2015).
- 32- CAROBREZ, A. & BERTOLGIO, L. ETHOLOGICAL AND TEMPORAL ANALYSES OF ANXIETY-LIKE BEHAVIOR: THE ELEVATED PLUS-MAZE MODEL 20 YEARS ON. *NEUROSCI BIOBEHAV REV.* 29, 1193-1205 (2005).
- 33- 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).
- 34- CRUZ, A., FREI, F. & GRAEFF F. ETHOPHARMACOLOGICAL ANALYSIS OF RAT BEHAVIOR ON THE ELEVATED PLUS-MAZE. *PHARMACOL BIOCHEM BEHAV* 49, 171-176 (1994).
- 35- CALABRESE, E. AN ASSESSMENT OF ANXIOLYTIC DRUG SCREENING TESTS: HORMETIC DOSE RESPONSES PREDOMINATE. *CRIT REV TOXICOL.* 38, 489-542 (2008).
- 36- WALF, 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).
- 37- BILKEI-GORZÓ, A. & GYERTYÁN I. SOME DOUBTS ABOUT THE BASIC CONCEPT OF HOLE-BOARD TEST. *NEUROBIOLOGY* 4, 405-415 (1996).
- 38- 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).
- 39- HILL, T. & LEWICKI, P. STATISTICS METHODS AND APPLICATIONS. *TATSOFT.COM* (2018) AT [HTTP://WWW.STATSOFT.COM/TEXTBOOK/](http://www.statsoft.com/textbook/)
- 40- ARCHER, J. TESTS FOR EMOTIONALITY IN RATS AND MICE: A REVIEW. *ANIM BEHAV.* 21, 205-235 (1973).
- 41- 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.* 2009;4(4):e5343.
- 42- JOSÉ JAIME HP, VENUS BC, GRACIELA JR, TANIA HH, LUCÍA 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.
- 43- J. MANIAM AND M. J. MORRIS, "THE LINK BETWEEN STRESS AND FEEDING BEHAVIOUR," *NEUROPHARMACOLOGY*, VOL. 63, NO. 1, PP. 97-110, 2012.
- 44- 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).
- 45- 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).
- 46- ARCHER, J. TESTS FOR EMOTIONALITY IN RATS AND MICE: A REVIEW. *ANIMAL BEHAVIOUR* 21, 205-235 (1973).
- 47- 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).
- 48- 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).
- 49- 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).
- 50- 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).
- 51- MERRIFIELD, MATT AND OLGA KOVALCHUK. "EPIGENETICS IN RADIATION BIOLOGY: A NEW RESEARCH FRONTIER" *FRONTIERS IN GENETICS* VOL. 4 40. 4 APR. 2013, DOI:10.3389/FGENE.2013.00040
- 52- CRAIG, K., BROWN, K. & BAUM, A. ENVIRONMENTAL FACTORS IN THE ETIOLOGY OF ANXIETY. *PSYCHOPHARMACOLOGY* 1325-1339 (1995).
- 53- BASKAR, R. & DEVI, P. INFLUENCE OF GESTATIONAL AGE TO LOW-LEVEL GAMMA IRRADIATION ON POSTNATAL BEHAVIOR IN MICE. *NEUROTOXICOL TERATOL.* 22, 593-602 (2000).
- 54- 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).

Tables

Table 1

Mean body weights of rats after and before parturition, litter size and pregnancy duration for irradiated (on gestational day 8 [IR8d] or 15 [IR15d]) and sham-irradiated control (CTL) rats. Values are mean $\pm$ SE, n=36.

	CTL (n=12)	IR8d (n=12)	IR15d (n=12)
Body weight F0 before parturition (g)	321.7 ± 9.6	332.3 ± 13.5	342.1 ± 13.4
Body weight F0 after parturition (g)	260.4 ± 6.3	276.1 ± 8.7	266.6 ± 8.9
Litter size	10.1 ± 0.5	10.2 ± 0.7	10.9 ± 0.8
Pregnancy duration (days)	22.0 ± 0.1	21.7 ± 0.2	21.8 ± 0.3

Table 2

Mean body weights of F1 irradiated (on gestational day 8 [IR8d] or 15 [IR15d]) and sham-irradiated control (CTL) rats at four different ages. Values are mean ± SE, n=144.

	CTL (n=48)	IR8d (n=48)	IR15d (n=48)
Body weight F1 pups 96 h after birth (g)	12.2 ± 0.1	12.4 ± 0.1	12.4 ± 0.3
Body weight F1 aged 30 days old (g)	100.0 ± 2.2	102.2 ± 1.2	100.6 ± 1.5
Body weight F1 aged 70 days old (g)	383.8 ± 5.9	331.7 ± 2.0**	355.1 ± 2.8**
Body weight F1 aged 91 days old (g)	474.5 ± 4.8	412.5 ± 4.7**	441.2 ± 2.6**

****P < 0.01**, ANOVA followed by post-hoc Tukey's honestly significant difference test, compared with control (CTL).

Table 3

Neurodevelopmental reflex tests in sham-irradiated control (CTL) and irradiated (on gestational day 8 [IR8d] or 15 [IR15d]) newborn rats: eye-opening, first climb and time to climb at 15 days old in negative geotaxis test. Values are mean ± SE, n=144.

Treatment	CTL (n=48)	IR8d (n=48)	IR15d (n=48)
Eye-opening (days)	12.8 ± 0.2	15.2 ± 0.7**	12.3 ± 0.2
First climb (days)	9.4 ± 0.4	14.4 ± 0.5**	12.2 ± 0.2**
Time to climb at 15 days old (s)	5.4 ± 0.3	6.2 ± 0.3	5.9 ± 0.2

****P < 0.01**, ANOVA followed by post-hoc Tukey's honestly significant difference test, compared with control (CTL).

Table 4

Open field behavior of prenatally irradiated (on gestational day 8 [IR8d] or 15 [IR15d]) and sham-irradiated control (CTL) young (30 days old) and adult (70 days old) rats. Values given as means ± SE, n=144 (young) and n= 134 (adult).

Behavioral parameter	Young			Adult		
	CTL (n=48)	IR8d (n=48)	IR15d (n=48)	CTL (n=47)	IR8d (n=40)	IR15d (n=47)
Number of squares entered	87.6 ± 0.9	102.9 ± 1.4**	83.8 ± 1.6	76.2 ± 1.7	54.9 ± 2.5**	65.8 ± 0.9**
Rearing	5.3 ± 0.1	7.6 ± 0.1**	3.1 ± 0.2**	3.3 ± 0.3	6.5 ± 0.4**	2.7 ± 0.3
Time to first cross the center	163.1 ± 5.9	172.4 ± 4.6	166.8 ± 3.9	176.8 ± 1.6	175.4 ± 2.2	175.9 ± 2.5
Number of crossings by the center	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.1

****P < 0.01**, ANOVA followed by post-hoc Tukey's honestly significant difference test, compared with control (CTL).

Table 5

The behavior of young and adult rats in the elevated plus-maze test prenatally irradiated (on gestational day 8 [IR8d] or 15 [IR15d] and sham-irradiated control (CTL) young (30 days old) and adult (70 days old) rats. Values given as means $\pm$ SE, n=144 (young) and n= 134 (adult).

		Young			Adult		
Treatment		CTL (n=48)	IR8d (n=48)	IR15d (n=48)	CTL (n=47)	IR8d (n=40)	IR15d (n=47)
Open arms	Number of entries	12.4 $\pm$ 0.5	17.7 $\pm$ 0.5**	12.6 $\pm$ 0.3	10.5 $\pm$ 0.3	7.6 $\pm$ 0.4**	6.3 $\pm$ 0.4**
	Time spent (s)	121.3 $\pm$ 3.5	152.3 $\pm$ 2.3**	122.7 $\pm$ 1.7	102.4 $\pm$ 2.1	183.2 $\pm$ 3.6**	92.3 $\pm$ 3.9
Closed arms	Number of entries	11.2 $\pm$ 0.3	12.1 $\pm$ 0.3	11.2 $\pm$ 0.2	7.5 $\pm$ 0.3	6.8 $\pm$ 0.3	8.3 $\pm$ 0.3
	Time spent (s)	113.5 $\pm$ 5.3	80.8 $\pm$ 1.9**	120.7 $\pm$ 1.8	118.2 $\pm$ 2.9	94.5 $\pm$ 3.0**	120.1 $\pm$ 3.1

****P < 0.01**, ANOVA followed by post-hoc Tukey's honestly significant difference test, compared with control (CTL).

Table 6

The percentages of young and adult rats in the elevated plus-maze test prenatally irradiated (on gestational day 8 [IR8d] or 15 [IR15d] and sham-irradiated control (CTL) young (30 days old) and adult (70 days old) rats. Values given as means, n=144 (young) and n= 134 (adult).

Treatment	Young			Adult		
	CTL (n=48)	IR8d (n=48)	IR15d (n=48)	CTL (n=47)	IR8d (n=40)	IR15d (n=47)
% time on open arms	51.7	65.3	50.4	46.4	66.0	43.5
% open arms entries	52.5	59.4	52.9	58.3	52.8	43.2
Total number of entries	23.6	29.8	23.8	18.0	14.4	14.6

Table 7

The behavior of young and adult rats in the Hole board test prenatally irradiated (on gestation day 8 [IR8d] or 15 [IR15d]) and sham-irradiated control (CTL) young (30 days old) and adult (70 days old) rats. Values given as means $\pm$ SE, n=144 (young) and n= 134 (adult).

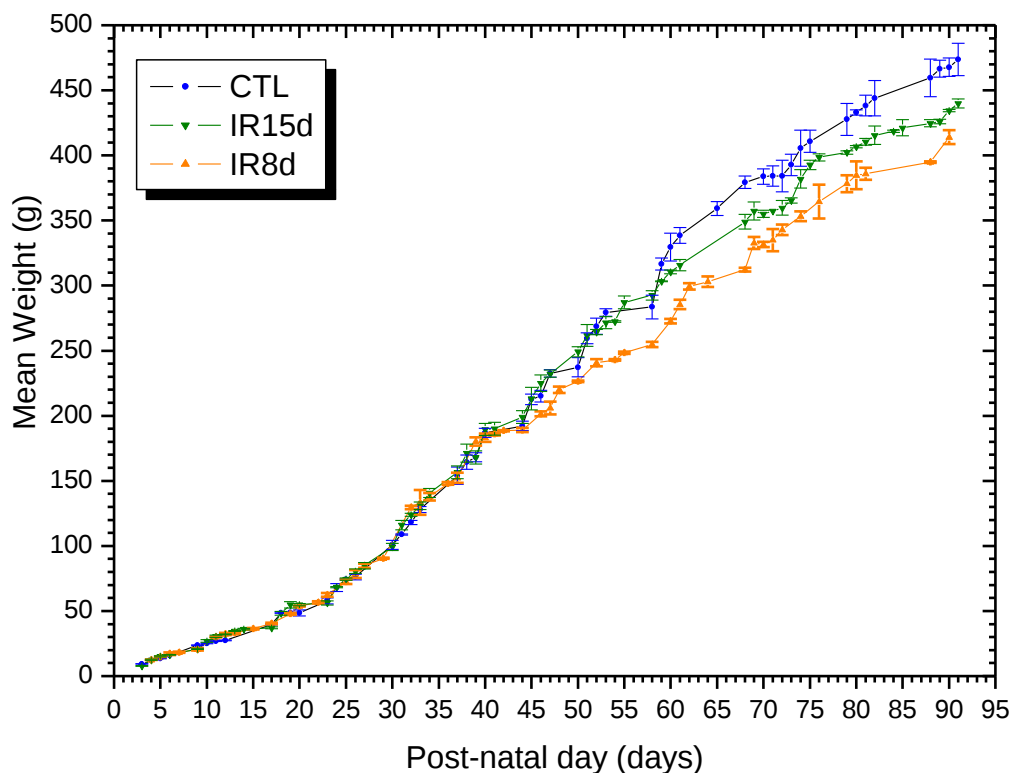
	Behavioral parameter	CTL (n=48)	IR8d (n=48)	IR15d (n=48)
Young	Number of head dip	15.5 $\pm$ 1.2	8.8 $\pm$ 0.3**	13.4 $\pm$ 0.4
	Number of legs dip	8.0 $\pm$ 0.4	11.4 $\pm$ 0.5**	9.4 $\pm$ 0.4
	Behavioral parameter	CTL (n=47)	IR8d (n=40)	IR15d (n=47)
Adult	Number of head dip	4.2 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.2*	5.6 $\pm$ 0.4*
	Number of legs dip	1.8 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.3**	2.6 $\pm$ 0.2*

***P < 0.05**, ANOVA followed by post-hoc Tukey's honestly significant difference test, compared with control (CTL).

****P < 0.01**, ANOVA followed by post-hoc Tukey's honestly significant difference test, compared with control (CTL).

Figure 1

The mean body weight in grams on the three groups: prenatally irradiated (on gestation day 8 [IR8d] or 15 [IR15d]) and sham-irradiated control (CTL). Values given as means $\pm$ SE, n=144.



Additional Information

Author Contributions

R.S.G. and H.C.D. designed the project; R.S.G., G.H.A., T.H.H. and I.R.P. performed the housing, husbandry, weighing, behavioral tests, and video evaluation, under supervision of H.C.D. and F.A.G.; H.C.D. and F.A.G. contributed with lab equipment, test devices and animals. R.S.G., N.L., L.V., H.C.D. and J.M.H. performed data analysis. R.S.G. and M.L.A. wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing financial and non-financial interests.

Data Availability Statement

Authors commit to make all data available.