



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

RAFAELA MENEZES MIRANDA

USO DOS GENES *Bmp4*, *Egr3* E *Hsp70* COMO POSSÍVEIS
MARCADORES DE TOXICIDADE EMBRIONÁRIA

UBERLÂNDIA

2026



RAFAELA MENEZES MIRANDA

**USO DOS GENES Bmp4, Egr3 E Hsp70 COMO POSSÍVEIS
MARCADORES DE TOXICIDADE EMBRIONÁRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Experimentação animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

Co-orientador: Dr. Murilo Vieira da Silva

UBERLÂNDIA

2026

RAFAELA MENEZES MIRANDA

**USO DOS GENES Bmp4, Egr3 E Hsp70 COMO POSSÍVEIS
MARCADORES DE TOXICIDADE EMBRIONÁRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Experimentação animal

Uberlândia, 10 de março de 2026.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira (UFU)

Dra. Flávia Batista Ferreira (UFU)

Prof. Dra. Paula Cristina Batista de Faria Gontijo (UFU)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus por me conceder criatividade, disposição para sonhar, capacidade e oportunidades para transformar meus sonhos em realidade. Em seguida, quero agradecer, em especial, à minha mãe, Annazyta. Ela é a base de tudo o que construí. Mesmo estando a 400 km de distância, nunca descansou quando o assunto era me apoiar e acreditar nos meus sonhos, mesmo quando eu mesma não acreditava. Grande parte deste sonho, mãe, nasceu da inspiração que a senhora representa para mim.

Aos meus avós, Marildes e Roberto, que não apenas fizeram de suas casas um lar para mim, mas também fizeram o possível e o impossível para que eu pudesse me formar com dignidade, confiança e oportunidades. Aliviando minhas preocupações de maneira amorosa e acolhedora, me proporcionaram momentos que só posso agradecer a Deus por permitir. Amo vocês eternamente.

Vinda de uma família extensa, acredito que nenhum sucesso acontece sozinho. Recebi apoio de tantos familiares que seria impossível citá-los a todos, mas quero agradecer meu pai e ao prédio Juvenira inteiro, que me acolheu e apoiou e à minha avó Neide, que, mesmo estando muito longe, me possibilitou conquistar muitas coisas que nunca imaginei poder. Obrigada por isso.

Aos três maiores grupos que me acompanharam durante a graduação: meus amigos desde o primeiro semestre da turma 16, especialmente Júlia, Angélica e Arthus; meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ueira, e meu coorientador, Prof. Dr. Murilo Vieira, por me oferecerem todo o apoio e orientação que tornaram este trabalho possível; e todos os pesquisadores do LABME, Flávia e Isabela, pelo acolhimento e por me permitir aprofundar em duas áreas que me fizeram escolher a Biomedicina (Genética e Reprodução), formando amigos de diversas profissões, especialmente Laura e Milene - obrigada por cada experimento compartilhado, pelos que deram certo e, principalmente, pelos que deram errado. À LAGEM, vocês me proporcionaram uma família e a oportunidade de explorar meu lado de liderança, por meio da coordenação discente. Agradeço especialmente à Prof. Paula, Camilly, Maria Júlia, Larissa, Fernanda e Marina. Serei eternamente grata por tudo, vocês são especiais.

Aos meus amigos de Brasília, em especial a Yasmin, Daniela e as Amadinhas que permaneceram comigo mesmo à distância: obrigada por todo o apoio enviado de longe e por nunca desistirem de mim.

Por fim, à Universidade Federal de Uberlândia, pelo amplo leque de oportunidades e por abrir as portas para o futuro que sempre sonhei.

"Você poderia sacudir as estrelas", ela sussurrou.
"Você poderia fazer qualquer coisa, se apenas você se atrevesse. E no fundo, você sabe disso também. Isso é o que mais te assusta."
— Trono de Vidro

RESUMO

Os modelos animais continuam sendo relevantes na pesquisa científica por permitirem a investigação integrada de processos fisiológicos e patológicos. Sua utilização deve ser fundamentada em critérios éticos e científicos, considerando a adequação do modelo aos objetivos do estudo. Assim, a pesquisa deve incentivar a adoção de métodos alternativos, como o uso de embriões, que contribuam para a diminuição do número de animais utilizados, possibilitem abordagens experimentais menos invasivas e favoreçam, sempre que viável, a substituição parcial ou total do uso de animais, em conformidade com os princípios dos 3 R's (Redução, Refinamento e Substituição). Neste estudo, 33 embriões de *Mus musculus* no estágio de duas células foram expostos *in vitro* aos herbicidas Pendimetalina e Prowl®H2O, com o objetivo de avaliar alterações morfológicas até o estágio de blastocisto por meio da classificação *in house* e classificação de Gardner, baseado no grau de expansão do blastocisto e na qualidade da massa celular interna (ICM) e do trofotoderma (TE); e alterações na expressão dos genes *Bmp4*, *Egr3* e *Hsp70* por meio da técnica RT-qPCR. A análise morfológica revelou atraso no desenvolvimento, fragmentação celular e vacuolização citoplasmática, sendo os efeitos mais pronunciados no grupo exposto ao Prowl®H2O. A análise molecular demonstrou aumento significativo na expressão de *Bmp4* no grupo tratado com Prowl®H2O, enquanto *Egr3* e *Hsp70* apresentaram maior expressão nos embriões expostos à Pendimetalina, sugerindo ativação de vias de estresse celular e desregulação de processos de desenvolvimento. Esses resultados indicam que tanto o princípio ativo isolado quanto a formulação comercial podem induzir alterações morfológicas e moleculares precoces, evidenciando a importância da avaliação integrada de parâmetros morfológicos e moleculares em estudos de toxicidade.

Palavras-chave: Métodos alternativos; RT-qPCR; Embriotoxicidade; Herbicidas.

ABSTRACT

Animal models remain relevant in scientific research because they allow the integrated investigation of physiological and pathological processes. Their use must be based on ethical and scientific criteria, considering the suitability of the model to the study objectives. Therefore, research should encourage the adoption of alternative methods, such as the use of embryos, which contribute to reducing the number of animals used, enable less invasive experimental approaches, and, whenever feasible, promote the partial or total replacement of animal use, in accordance with the principles of the 3 R's (Reduction, Refinement, and Replacement). In this study, 33 *Mus musculus* embryos at the two-cell stage were exposed *in vitro* to the herbicides Pendimethalin and Prowl®H2O, with the aim of evaluating morphological alterations up to the blastocyst stage through in house and Gardner's classification, based on the degree of blastocyst expansion and the quality of the inner cell mass (ICM) and the trophectoderm (TE), as well as changes in the expression of the genes *Bmp4*, *Egr3*, and *Hsp70* using the RT-qPCR technique. Morphological analysis revealed developmental delay, cellular fragmentation, and cytoplasmic vacuolization, with more pronounced effects observed in the group exposed to Prowl®H2O. Molecular analysis demonstrated a significant increase in *Bmp4* expression in the group treated with Prowl®H2O, while *Egr3* and *Hsp70* showed higher expression in embryos exposed to Pendimethalin, suggesting the activation of cellular stress pathways and dysregulation of developmental processes. These results indicate that both the isolated active ingredient and the commercial formulation can induce early morphological and molecular alterations, highlighting the importance of the integrated evaluation of morphological and molecular parameters in toxicity studies.

Keywords: Alternative methods; RT-qPCR; Embryotoxicity; Herbicides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diferenciação das células germinativas em camundongos: (A) via espermatogênica e (B) via oogênica.....	15
Figura 2 - Representação esquemática das etapas do desenvolvimento embrionário pré-implantacional em camundongos, do zigoto ao blastocisto.....	16
Tabela 1 - Métodos alternativos reconhecidos pela Resolução Normativa nº 31 do CONCEA para avaliação de toxicidade reprodutiva.....	18
Figura 3 - Representação esquemática da localização dos genes <i>Bmp4</i> e <i>Egr3</i> em <i>Mus musculus</i> e principais funções biológicas associadas à sua expressão.....	22
Figura 4 - Representação esquemática da localização do gene <i>Hsp70</i> em <i>Mus musculus</i> e principais funções biológicas associadas à sua expressão.....	23
Figura 5 - Representação esquemática do desenho experimental do estudo.....	27
Tabela 2 - Blastocistos classificados de acordo com o grau de expansão da blastocele.....	29
Tabela 3 - Blastocistos classificados de acordo com grau de qualidade das células.....	29
Figura 6 - Representação da classificação morfológica de blastocistos de acordo com o sistema de Gardner.....	30
Tabela 4 - Classificação do grupo de acordo com a viabilidade dos embriões.....	30
Tabela 5. Sequência dos primers utilizados para análise da expressão gênica de embriões em <i>Mus musculus</i> por RT-qPCR.....	31
Figura 7 - Alterações morfológicas indicativas de degeneração em embriões C57BL/6J. Setas vermelhas indicam divisão desigual dos blastômeros, setas azuis indicam vacuolização citoplasmática e setas verdes indicam fragmentação celular.....	33
Figura 8 - Classificação morfológica e viabilidade embrionária de embriões C57BL/6J.....	34
(A) Ilustração esquemática da classificação de blastocistos de acordo com a qualidade da Massa Celular Interna (ICM) e do Trofoectoderma (TE), utilizada para avaliação da viabilidade embrionária. (B) Porcentagem de embriões considerados viáveis nos grupos controle, expostos à Pendimetalina (linha vermelha) e ao Prowl® H ₂ O (linha verde), ao longo dos dias de observação (D0, D1, D2 e D3).....	34
Figura 9 - Gráfico da classificação dos embriões de C57BL/6J de acordo com a quantidade de embriões viáveis dos grupos: controle, Pendimetalina (P) e Prowl®H ₂ O (A).....	35

Figura 10 - Expressão relativa do gene *Bmp4* em embriões C57BL/6J dos grupos controle (G1), Pendimetalina (G2) e Prowl®H2O (G3). A expressão gênica foi determinada por RT-qPCR e normalizada pelo gene de referência *Gapdh*, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). Diferenças significativas foram observadas entre G1 e G3 ($p = 0,0005$) e entre G2 e G3 ($p = 0,0006$), enquanto não foi observada diferença significativa entre G1 e G2 ($p = 0,7764$)..... 36

Figura 11 - Expressão relativa do gene *Egr3* em embriões C57BL/6J dos grupos controle (G1), Pendimetalina (G2) e Prowl®H2O (G3). A expressão gênica foi determinada por RT-qPCR e normalizada pelo gene de referência *Gapdh*, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). Diferenças significativas foram observadas entre G1 e G2 ($p = 0,0014$), entre G1 e G3 ($p = 0,0131$) e entre G2 e G3 ($p = 0,0091$)..... 37

Figura 12 - Expressão relativa do gene *Hsp70* em embriões C57BL/6J dos grupos controle (G1), Pendimetalina (G2) e Prowl®H2O (G3). A expressão gênica foi determinada por RT-qPCR e normalizada pelo gene de referência *Gapdh*, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). Diferenças significativas foram observadas entre G1 e G2 ($p = 0,0007$) e entre G2 e G3 ($p = 0,0008$), não sendo observada diferença significativa entre G1 e G3 ($p > 0,9999$)..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS

3R's	Substituição, Redução e Refinamento
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
PGC	Célula Germinativa Primordial
Concea	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
ICM	Massa Celular Interna
REBIR	Rede de Biotérios de Roedores
TE	Trofoectoderme
ExEC	Ectoderma extraembrionário
ExM	Mesoderma extraembrionário
<i>Bmp4</i>	Proteína Morfogenética Óssea 4
<i>Egr3</i>	Resposta de Crescimento Precoce 3
<i>Hsp70</i>	Proteína de Choque Térmico 70
<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
TGFB	Fator de Crescimento Transformador Beta
µg/mL	Micrograma por microlitro
<i>et al</i>	E outros
UI	Unidade Internacional
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. A Utilização de Camundongos em Estudos Científicos e as Práticas de Bem-Estar Animal	12
1.2. Métodos Alternativos	13
1.3. Gametogênese e Embriogênese	14
1.4. Embriotoxicidade	16
1.5. Herbicidas Prowl®H2O e Pendimetalina	18
1.6. Avaliação Morfológica	19
1.7. Avaliação Molecular	20
1.7.1. <i>Bmp4</i>	20
1.7.2. <i>Egr3</i>	21
1.7.3. <i>Hsp70</i>	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVO	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. METODOLOGIA	26
4.1. Animais	26
4.2. Desenho Experimental	26
4.3. Superovulação e Coleta de Embriões	27
4.4. Cultura Embrionária e Tratamentos	28
4.5. Análise do Desenvolvimento/Morfologia Embrionária	28
4.6. Análise Molecular dos Embriões	31
4.7. Interpretação dos Dados	32
5. RESULTADOS	33
5.1 Análise Morfológica	33
5.2 Análise Molecular e Estatística	35
5.2.1 <i>Bmp4</i>	35
5.2.2 <i>Egr3</i>	36
5.2.3 <i>Hsp70</i>	37
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO I	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Utilização de Camundongos em Estudos Científicos e as Práticas de Bem-Estar Animal

Os organismos modelo são geralmente definidos como espécies não humanas que são extensivamente estudadas para compreender uma ampla variedade de fenômenos biológicos, partindo do pressuposto de que o conhecimento obtido possa ser aplicado a outros seres vivos, especialmente aos mais complexos (Shecaira *et al.*, 2021). Dessa forma, ampliando a compreensão geral da biologia, uma vez que compartilham com os humanos diversos mecanismos genéticos, moleculares e fisiológicos fundamentais (Leonelli, 2013). Nesse contexto, as contribuições dos animais de laboratório para a pesquisa biomédica são imensuráveis, destacando-se os roedores como os modelos experimentais mais utilizados, em razão de características como fácil manejo, sociabilidade, adaptação ao cativeiro e ciclo reprodutivo curto (Shecaira *et al.*, 2021).

O camundongo, pertencente à classe *Mammalia*, ordem *Rodentia*, família *Muridae*, gênero *Mus* e espécie *Mus musculus*, ocupa posição de destaque nas pesquisas biomédicas não apenas pela praticidade experimental, mas também pela elevada similaridade genética com os seres humanos, já que aproximadamente 90% dos genomas de ambas as espécies podem ser organizados em regiões com estrutura gênica semelhante (Breschi; Ginjeiras; Guigó, 2017). Além disso, camundongos e humanos apresentam notáveis semelhanças na morfogênese de embriões, apesar das diferenças no tempo de segregação das linhagens celulares (Molè; Weberling; Zernicka-Goetz, 2020), sendo a cepa C57BL/6 (B6) a mais amplamente empregada em pesquisas biomédicas (Mekada; Yoshiki, 2021). A linhagem C57BL/6J é classificada como *inbred*, caracterizando-se por indivíduos geneticamente definidos e altamente homocigotos. Essa uniformidade genética reduz a variabilidade experimental, permitindo a obtenção de resultados mais consistentes e a condução de estudos com menor número de animais, sem prejuízo da validade estatística (Bryant, 2011).

O processo experimental animal também apresenta questões éticas envolvidas, sendo um valor essencial para que haja um equilíbrio entre o avanço da ciência biomédica e o bem-estar animal (Mendes, 2017). Em 1959, dois cientistas, Russell e Burch, formularam o princípio dos 3 R's, que incentivou a implantação de três ações na experimentação animal: substituição (do inglês *replacement*), quando existir método substitutivo validado, tornando injustificável o uso de animais; redução (do inglês *reduction*), que preconiza a utilização do

menor número de animais necessário para a obtenção de resultados cientificamente válidos; e refinamento (do inglês *refinement*), que consiste na adoção de procedimentos que minimizem o sofrimento, a dor ou o estresse dos animais, quando sua utilização for imprescindível (Silva; Silva, 2024).

No Brasil, a utilização de animais em pesquisa é regulamentada pela Lei nº 11.794/2008, conhecida como Lei Arouca, e supervisionada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que exige a aprovação prévia de todos os protocolos experimentais pelos Comitês de Ética no Uso de Animais (CEUAs) (Guimarães *et al.*, 2016). Destaca-se ainda que o Governo Federal, por meio do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, instituiu a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), com o objetivo de reduzir o uso de animais em experimentos, substituir métodos tradicionais por alternativas igualmente ou mais eficazes e refinar técnicas já consolidadas. Além de promover a validação de métodos alternativos, a RENAMA também patrocina e fomenta pesquisas voltadas ao desenvolvimento e à implementação dessas abordagens no país (Shecaira *et al.*, 2021).

1.2. Métodos Alternativos

Os modelos animais permanecem e continuarão sendo essenciais para o desenvolvimento científico por muitos anos (Klein *et al.*, 2024), pois fornecem uma perspectiva abrangente do organismo como um todo, permitindo a compreensão integrada de processos biológicos complexos que ainda demandam um contexto sistêmico para serem plenamente compreendidos (Chang; Grieder, 2024). Contudo, amplia-se a busca por estratégias que aliem rigor científico e responsabilidade ética, especialmente por meio da aplicação dos princípios dos 3 R's. A adoção de modelos alternativos, contribui para diminuir o número de animais utilizados, aperfeiçoar as técnicas experimentais e, sempre que possível, substituir parcial ou totalmente o uso de animais, sem comprometer a qualidade e a validade científica dos estudos (Vasconcellos, 2019).

Os métodos alternativos ao uso de animais podem ser definidos como qualquer metodologia que possibilite substituir, reduzir ou refinar o uso pedagógico ou científico de biomodelos (Concea, 2015). Essas metodologias são definidas, ainda, como ensaios validados e aceitos internacionalmente que garantam resultados similares e com reprodutibilidade para alcançar, sempre que possível, a mesma finalidade dos procedimentos substituídos (Pedro, 2021).

Métodos alternativos devem ser considerados preferencialmente como uma

abordagem preliminar ou substituta aos modelos *in vivo*, com base em sua eficácia e simplicidade de prever a toxicidade em humanos. Esses avanços se alinham com os princípios dos 3 R's na experimentação animal, promovendo práticas de pesquisa mais éticas (Campitelli *et al.*, 2025). Dentro das possibilidades de modelo, os estudos com embriões de roedores são muito utilizados e recomendados (Van Soom *et al.*, 2011).

A maior parte do que sabemos sobre as decisões de destino celular no embrião de mamífero vem de estudos com o embrião de camundongo (Zhu; Zernicka-Goetz, 2020). Eles se destacam dos demais por oferecerem praticidade, relevância biológica e compatibilidade com técnicas experimentais avançadas. Além disso, seus ciclos reprodutivos são rápidos, o que facilita a obtenção de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento para experimentação (Sogorb *et al.*, 2014).

1.3. Gametogênese e Embriogênese

O camundongo torna-se apto à reprodução por volta dos 60 dias de idade, embora os primeiros efeitos hormonais já estejam presentes em ambos os sexos aproximadamente aos 30 dias, manifestando-se pela abertura da vagina nas fêmeas e pela descida e aumento dos testículos nos machos (Chorilli *et al.*, 2007). Esse amadurecimento sexual está diretamente relacionado à ativação e ao desenvolvimento das células germinativas, que são células especializadas responsáveis pela formação dos gametas, garantindo a transmissão do material genético entre gerações (Saitou, 2021).

As células germinais masculinas e femininas têm a mesma origem embrionária, desenvolvendo-se a partir das gônadas inicialmente indiferenciadas, que abrigam as células destinadas à formação dos gametas, bem como aquelas que posteriormente exercerão funções de suporte e de produção hormonal, como as células da granulosa e da teca no ovário, e as células de Sertoli e de Leydig no testículo (Isaque, 2018). A formação dos gametas compreende fases sequenciais de mitose, meiose I e meiose II. Esses processos são altamente organizados e necessitam de um preciso e bem coordenado programa de expressão genética (Saitou, 2021).

Nas gônadas, as células germinativas primordiais (PGCs) iniciam a diferenciação em direção a uma via espermatogênica (masculina) ou oogênica (feminina). Em machos, essas células originam os espermatozoides; já nas fêmeas, os oócitos (Figura 1). Durante esse processo, passam por uma reprogramação epigenética em escala genômica, na qual ocorre o apagamento da memória epigenética e o restabelecimento do potencial genômico para a totipotência (Lee & Surani, 2024).

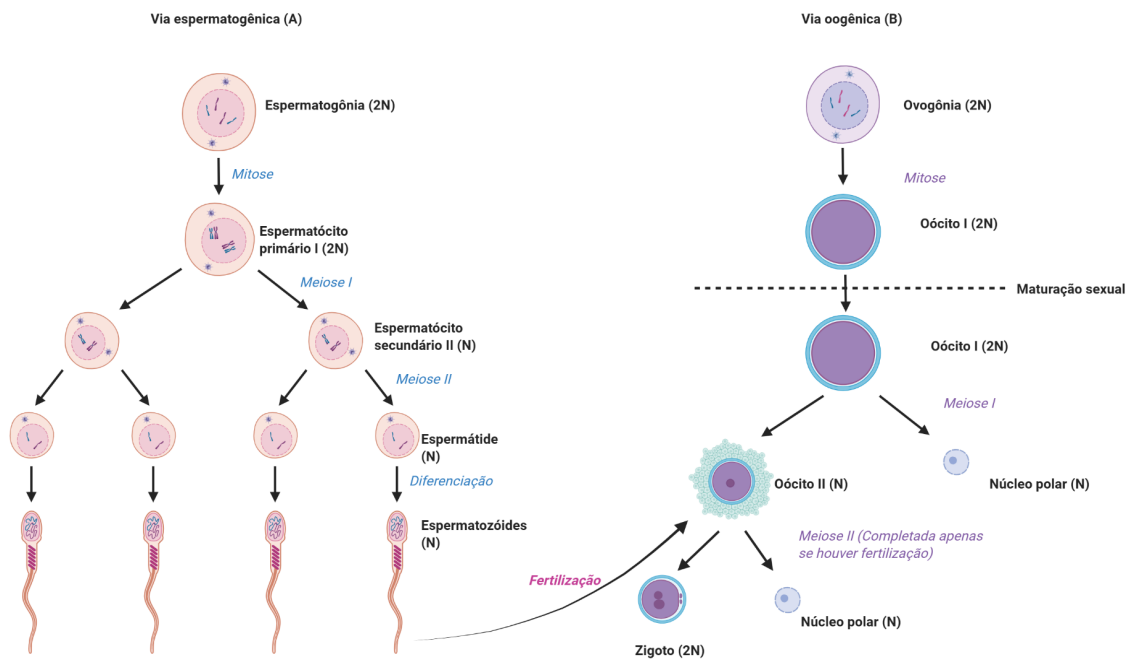


Figura 1 - Diferenciação das células germinativas em camundongos: (A) via espermatogênica e (B) via oogênica.

Fonte: Criado com BioRender.com pelo autor (2026).

O desenvolvimento pré-implantação de mamíferos começa com a formação de um zigoto totipotente assim que o oócito altamente especializado e o espermatozoide se fundem (Lee & Surani, 2024). Após isso, o embrião passará por uma série de clivagens pré-implantação que acarretarão os estados de mórula e, posteriormente, o de blastocisto. No camundongo, a totipotência, a capacidade de uma única célula de dar origem a todo o embrião - torna-se gradualmente perdida a partir do estágio de 4 células (Oh *et al.*, 2023).

Durante os estágios iniciais, o embrião de mamífero é cercado por uma casca de glicoproteína, a zona pelúcida, dentro da qual o embrião se desenvolve de uma única célula para uma esfera oca de mais de cem células, chamada blastocisto (Zhu; Zernicka-Goetz, 2020). Enquanto a maior parte das células da camada externa se tornará o trofoectoderma, indispensável para a formação da placenta e correta implantação do embrião no útero materno, o embrião propriamente dito se formará a partir de um pequeno grupo de células localizadas no interior do trofoblasto. Essas células são conhecidas como massa celular interna, são pluripotentes e darão origem ao embrião (Nikou, López Panadés & Roig, 2024) (Figura 2). Nessa fase do desenvolvimento é primordial que o funcionamento fisiológico esteja correto, pois qualquer alteração ou defeito podem acarretar em má formações ou letalidade do embrião (Xu *et al.*, 2020).

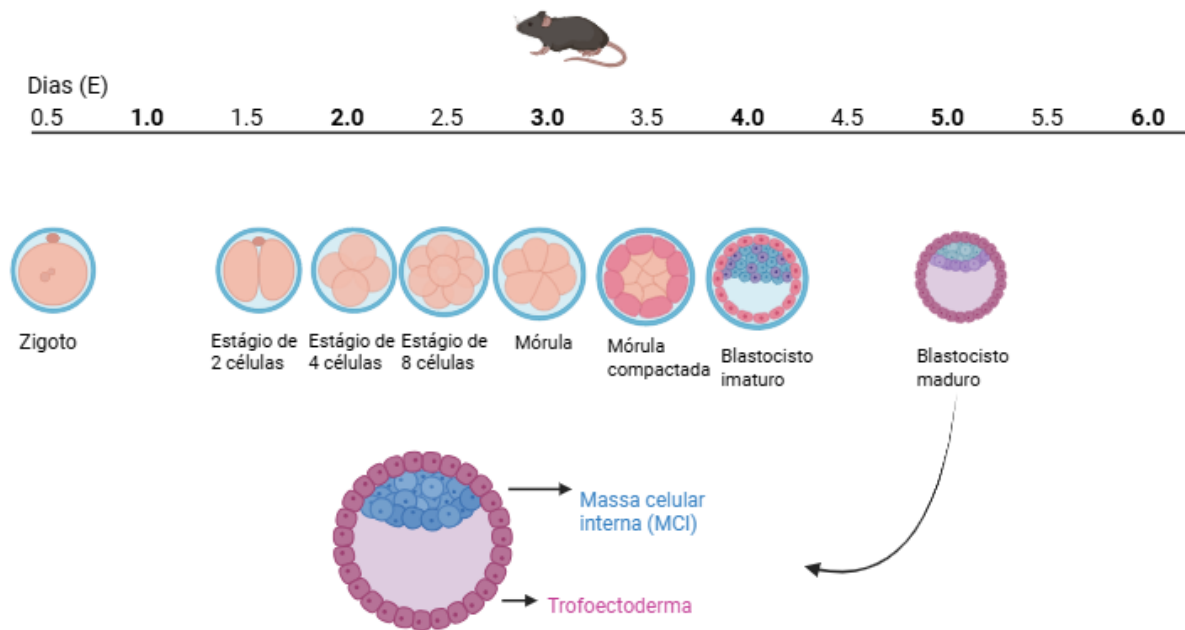


Figura 2 - Representação esquemática das etapas do desenvolvimento embrionário pré-implantacional em camundongos, do zigoto ao blastocisto.

Fonte: Criado com BioRender.com pelo autor (2026).

1.4. Embriotoxicidade

A embriotoxicidade é um fenômeno que pode ser definido como a capacidade de uma substância causar danos ao desenvolvimento embrionário e fetal (Santos; Emerich, 2023). Em estudos *in vitro*, os avanços tecnológicos na pesquisa científica têm possibilitado estudar e analisar a influência de substâncias em diferentes estágios da embriogênese, o que seria difícil de realizar com modelos animais (Campitelli *et al.*, 2025). Por isso, vários métodos alternativos *in vitro* foram desenvolvidos para testar a embriotoxicidade. Todos eles oferecem alta previsibilidade e concordância com os resultados dos testes *in vivo* e são mais baratos do que os testes *in vivo* (Sogorb *et al.*, 2014).

Dentre as possibilidades de modelos experimentais capazes de estimar esse tipo de toxicidade, temos os testes com embriões de camundongo. Esse modelo começou a ser utilizado para medição de embriotoxicidade e teratogenicidade de compostos químicos na década de 70 devido ao fato de ser um protocolo rápido, sensível e econômico (Sogorb *et al.*, 2014). Além disso, o desenvolvimento morfológico *in vitro* e a análise da expressão de genes estratégicos em embriões de camundongo na fase de pré-implantação são indicadores biológicos sensíveis de toxicidade, sendo um modelo utilizado de forma consolidada na

formulação de meios de cultura, no controle de qualidade de laboratórios de Fertilização *in vitro* (FIV) e desenho experimental de criopreservação de embriões humanos devido à alta semelhança no desenvolvimento inicial das duas espécies (Esfandiari; Gubista, 2020).

Toxicidade para a reprodução é um termo que engloba alterações na fertilidade e no desenvolvimento causadas por produtos químicos (Prior *et al.*, 2019). De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pela Lei Federal 7.802 de 11.07.89, os agroquímicos são definidos como: produtos ou agentes de processos físicos, químicos ou biológicos utilizados na produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagem e proteção de florestas, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Ou seja, são produtos que, quando aplicados atuam no sistema agrícola modificando de forma benéfica o sistema produtivo (Santoro, 2020).

A toxicidade no desenvolvimento são os efeitos adversos no organismo em crescimento desde o estado embrionário até o momento da maturação sexual (Sogorb *et al.*, 2014). Já a embriotoxicidade são os efeitos tóxicos na progênie entre a concepção e o estágio fetal, enquanto a teratogenicidade são malformações estruturais ou defeitos na prole após o período de embriogênese (Prior *et al.*, 2019). A avaliação de tais alterações pode ser feita por diferentes abordagens; por exemplo, alterações histológicas, genômicas, proteômicas e funcionais (Sogorb *et al.*, 2014).

A avaliação da embriotoxicidade dos agroquímicos é fundamental para identificar potenciais riscos que essas substâncias possam representar ao desenvolvimento embrionário, prevenindo danos reprodutivos e garantindo a segurança da saúde pública e ambiental. Os principais ensaios *in vitro* de embriotoxicidade baseiam-se na exposição de células estaminais em processo de diferenciação a um composto químico, seguida da avaliação das alterações induzidas por essa exposição (Pedro, 2021).

A Resolução Normativa CONCEA nº 31, publicada em 18 de agosto de 2016, reconhece no Brasil 7 métodos alternativos, sendo um deles a avaliação de toxicidade reprodutiva (Tabela 1). Nessas pesquisas é realizado teste de triagem para avaliar parâmetros reprodutivos e, também, a análise de doses repetidas por tempo limitado (Pedro, 2021).

Método alternativo	Desfecho
Método OECD TG 421- Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento	Avaliação de toxicidade reprodutiva
Método OECD TG 422- Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva	

Tabela 1 - Métodos alternativos reconhecidos pela Resolução Normativa nº 31 do CONCEA para avaliação de toxicidade reprodutiva.

Fonte: Adaptado de Pedro (2021).

A avaliação da toxicidade reprodutiva de produtos químicos é essencial para a segurança da comunidade e a proteção do meio ambiente. Esse processo garante a redução da exposição a substâncias perigosas e promove um manejo mais seguro para trabalhadores e demais seres vivos que possam entrar em contato com esses produtos. (ECHA, 2007; OECD, 2025).

1.5. Herbicidas Prowl®H2O e Pendimetalina

O registro e a fiscalização de defensivos agrícolas no Brasil são regidos por um sistema tripartite composto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O primeiro é responsável por avaliar a eficácia agrônômica desses produtos, o segundo, por conduzir a avaliação dos impactos dele em ecossistemas não-alvo, incluindo a fauna, a flora, o solo e os recursos hídricos e, por fim, o terceiro, pela avaliação toxicológica desses químicos para a saúde humana (Brasil, 2011). Nesse sistema é proibido, pelo Decreto nº 10.833 de 7 de outubro de 2021, o registro de agroquímicos que apresentem evidências de teratogenicidade, carcinogenicidade, mutagênese, causar distúrbios hormonais ou danos no sistema reprodutor (Brasil, 2021).

Os herbicidas são uma categoria de agrotóxico utilizados para proteger plantações de plantas indesejáveis consideradas “ervas daninhas” ou pragas. Estima-se que pelo menos 47,7% dos agrotóxicos utilizados no mundo pertencem a essa categoria e países como o Brasil se destacaram pela alta aplicação destes químicos em suas culturas (Pathak *et al.*, 2022). O

Prowl®H2O é um herbicida comercial contendo a Pendimetalina como princípio ativo na concentração 45,5% v/v. Registrado no Ministério da Agricultura e Pecuária sob o nº 05920, esse produto é classificado na categoria de perigo 4, considerado pouco tóxico, e com potencial de periculosidade ambiental II, muito perigoso para o meio ambiente (BASF, 2025).

A Pendimetalina [N-(1-ethylpropyl)-2,6-dinitro-3,4-xylidine] é um princípio ativo de herbicidas seletivos pré-emergenciais e atua especificamente inibindo a formação de microtúbulos durante a divisão celular das ervas-daninhas (Wang *et al.*, 2022). Além disso, a Pendimetalina atua inibindo a divisão celular e a mitose em plantas. Diversos estudos têm relatado os efeitos prejudiciais da Pendimetalina em organismos não alvo (Park *et al.*, 2021). Adicionalmente, esse composto é persistente no solo, com meia-vida de aproximadamente 69 dias. Seu uso e comercialização são permitidos e controlados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária tendo os padrões toxicológicos de: Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,1 mg/kg peso corpóreo; Dose de Referência Aguda (DRfA) = 1,0 mg/kg peso corpóreo (ANVISA, 2022).

Nesse contexto, a Pendimetalina e sua formulação comercial Prowl®H2O, se mostram compostos adequados de serem usados para investigação devido ao seu mecanismo de ação bem definido, sua relevância ambiental e pela falta de estudos voltados para o entendimento sobre seus potenciais efeitos no desenvolvimento embrionário (Ahmad *et al.*, 2018)

1.6. Avaliação Morfológica

Apesar do avanço científico na busca de aprimorar técnicas de avaliação qualitativa de embriões por meio de sequenciamento e marcação morfológica ou bioquímica, a avaliação morfológica por meio da microscopia continua sendo amplamente empregada por se tratar de um método não invasivo, econômico e confiável para mensurar a viabilidade celular e capacidade de desenvolvimento de um embrião (Nasiri & Eftekhari-Yazdi, 2015).

Vários sistemas de classificação morfológica de embriões e blastocistos foram desenvolvidos. No caso dos blastocistos, a avaliação e classificação morfológica geralmente consideram a morfologia da massa celular interna (ICM), a morfologia do trofotoderma (TE) e a expansão da cavidade. Alguns dos sistemas publicados para classificação de blastocistos incluem Gardner (2000), Balaban *et al.* (2006), Veeck & Zaninovic (2003) e Cecilia Sjoblom (2006).

Nenhum registro foi encontrado em relação a um consenso sobre sistemas de classificação de blastocistos na América Latina. Contudo, no Brasil e na Argentina, o sistema

de Gardner é o mais usado entre os embriologistas. Mesmo que essas escalas avaliem o desenvolvimento embrionário humano, devido à sua similaridade ao de outros animais como suínos e camundongos, elas podem servir de referência para aferição da qualidade de embriões de outros mamíferos (Pisko *et al.*, 2021).

De maneira geral, cada método faz a análise da qualidade para definir se é possível a viabilidade de um embrião no meio no qual ele se insere antes que ele alcance o estágio de implantação. Porém, com o objetivo de ter uma melhor compreensão acerca do tempo de desenvolvimento, regularidade das clivagens, fragmentação celular, número e forma de blastômeros e qualidade de massa interna de células e blastoderma, convém fazer uma análise sequencial do desenvolvimento embrionário (Pisko *et al.*, 2021).

Nesse sentido, a correlação entre diferentes técnicas aumenta a precisão do *score* qualitativo, uma vez que a avaliação morfológica isolada pode apresentar viés subjetivo do observador e a análise restrita a um único estágio embrionário limita a compreensão integrada do processo de desenvolvimento (Zhang *et al.*, 2021). Ressalta-se também, que, embora a fragmentação seja um processo natural de embriões humanos e de camundongos resultante do processo de apoptose embrionária, o excesso de estruturas citoplasmáticas extracelulares no embrião é um bom indicativo de um desequilíbrio no desenvolvimento podendo ser consequente do meio no qual o embrião está exposto ou de anomalias internas dele (Cai *et al.*, 2022).

1.7. Avaliação Molecular

A expressão de biomarcadores gênicos de diferenciação tem sido pesquisada como um desfecho molecular para estudar alterações de diferenciação de células (Sogorb *et al.*, 2014). Os camundongos são considerados um excelente modelo para estudos genéticos (Chorilli *et al.*, 2007). A exposição a compostos químicos durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário em camundongos provoca alterações significativas na expressão de genes associados à resposta ao estresse celular, apoptose e processos de diferenciação, resultando em comprometimento do desenvolvimento embrionário e aumento da mortalidade embrionária (Wolf, 2011).

1.7.1. *Bmp4*

A Proteína Morfogenética Óssea 4 (BMP4), expressada pelo gene homônimo presente no cromossomo 14 de *Mus musculus* (Figura 3), é um fator de crescimento secretado da superfamília do Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF β). As proteínas BMPs são

importantes durante a embriogênese, o comprometimento neuronal e a formação de sinapses (LÖNN *et al.*, 2005). Inicialmente, é a *BMP4* produzida pelo ectoderma extraembrionário ou células derivadas do trofotoderma do embrião (ExEc) que é necessário para o estabelecimento de PGC e alantóide (Roberts *et al.*, 2022).

O endoderma é um dos primeiros folhetos embrionários a se formar no embrião. É o tecido progenitor que dá origem à maioria dos sistemas de órgãos internos do corpo humano, incluindo os tratos respiratório e gastrointestinal, bem como seus órgãos vitais associados, como tireoide, fígado, pâncreas, próstata e bexiga. Consequentemente, os tecidos endodérmicos são necessários para muitos processos homeostáticos, como absorção de nutrientes, trocas gasosas, desintoxicação e homeostase da glicose. Isso torna o desenvolvimento adequado do endoderme crítico para muitas funções básicas (Nowotschin *et al.*, 2019).

Embora inicialmente descrita por seu papel na formação óssea, a sinalização da *BMP4* tem sido implicada no desenvolvimento (crescimento celular, apoptose e diferenciação), manutenção e regeneração de inúmeros tecidos e órgãos. Há também um corpo significativo de evidências apontando para um possível papel da sinalização de *Bmp4* no embrião pré-implantação (Roberts *et al.*, 2022).

1.7.2. *Egr3*

O gene *Early Growth Response 3 (Egr3)* é um fator de transcrição da família dos fatores de resposta imediata, tradicionalmente associado a processos neurobiológicos e musculares. Localiza-se nos fusos meióticos de oócitos murinos, sugerindo sua participação na organização do citoesqueleto durante a maturação oocitária e nos estágios iniciais de embriões pré-implantação. Os fusos meióticos dos oócitos ainda estão presentes nos embriões nos estágios iniciais de pré-implantação e são gradualmente substituídos pelos fusos mitóticos à medida que o desenvolvimento progride (Shin *et al.*, 2014).

Os papéis de *Egr3* (Figura 3) na morfogênese dos fusos musculares e nas funções neurológicas foram estabelecidos por uma série de estudos utilizando camundongos deficientes em *Egr3*. Esses estudos demonstraram a importância do gene na modulação do desenvolvimento do sistema nervoso, dos linfócitos e dos fusos musculares, além de seu papel na regulação da plasticidade sináptica, aprendizagem, memória, imunidade, resposta inflamatória, angiogênese, proliferação celular, diferenciação, entre outros processos. Além disso, evidenciaram que o *Egr3* foi detectado no embrião de camundongo durante os estágios

de 2 células, 4 células, mórula e blastocisto, e que sua deficiência resultou em anormalidades na embriogênese (Yue *et al.*, 2023).

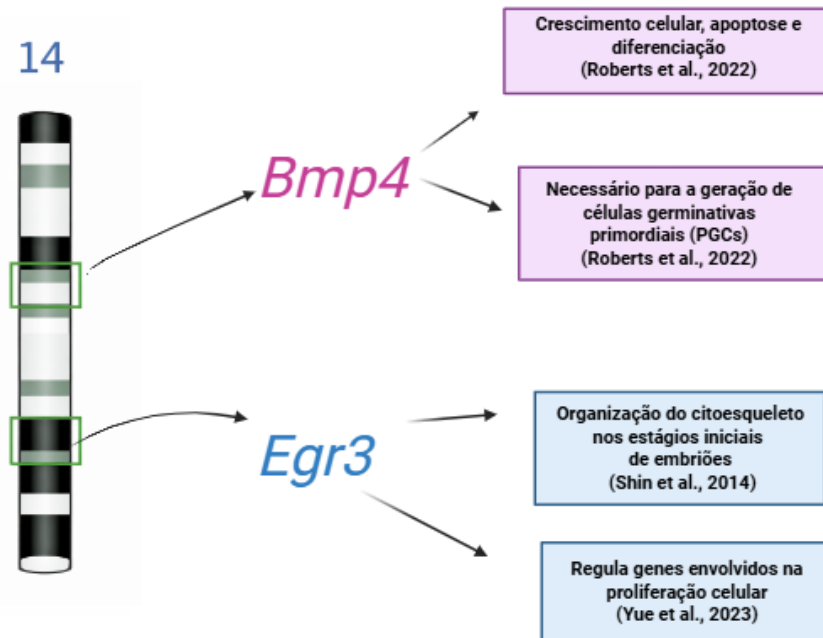


Figura 3 - Representação esquemática da localização dos genes *Bmp4* e *Egr3* em *Mus musculus* e principais funções biológicas associadas à sua expressão.

Fonte: Criado com BioRender.com pelo autor (2026).

1.7.3. *Hsp70*

Os genes da família *Hsp70*, que codificam proteínas de choque térmico de 70 kDa, estão localizados no cromossomo 17 em camundongos (Figura 4), sendo essa região importante para a regulação de respostas ao estresse e potenciais efeitos sobre o desenvolvimento embrionário (Lee *et al.*, 2002). Como membro da superfamília das HSPs (proteínas de choque térmico), a HSP70 pode atuar como uma chaperona molecular, auxiliando na resposta celular ao estresse ao resistir à apoptose e ao estresse oxidativo, além de regular respostas imunológicas (Rosenzweig *et al.*, 2019).

Além da expressão em tumores e em órgãos sensíveis, como o cérebro e o coração, a *Hsp70* também é expressa nos ovários, endométrio, decídua, placenta e no líquido amniótico, podendo desempenhar um papel na oogênese e na embriogênese (Rosenzweig *et al.*, 2019). O organismo pode proteger sua função reprodutiva por meio do aumento da expressão de *Hsp70* induzida em resposta a diferentes agentes estressores, como compostos químicos, estresse oxidativo e alterações no microambiente celular, funcionando como um importante mecanismo de proteção da célula (Feder, 1999).

Em embriões de camundongo dos estágios de duas células provenientes de fêmeas submetidas a estresse crônico imprevisível, os níveis de mRNA de *Hsp70* foram significativamente maiores nos grupos de estresse leve e moderado em comparação com o grupo controle, sugerindo que a superexpressão de *Hsp70* pode ter um papel protetor no desenvolvimento embrionário sob estresse (Li *et al.*, 2015).

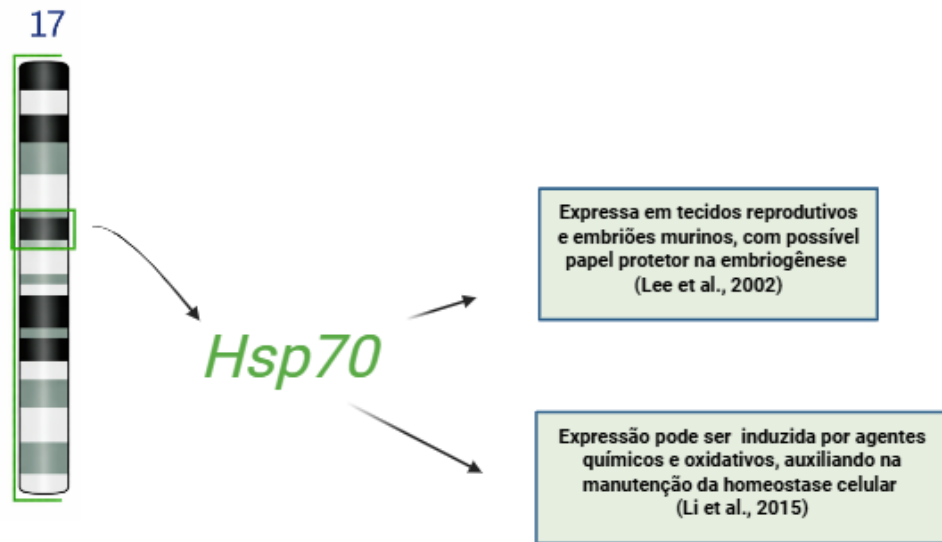


Figura 4 - Representação esquemática da localização do gene *Hsp70* em *Mus musculus* e principais funções biológicas associadas à sua expressão.

Fonte: Criado com BioRender.com pelo autor (2026).

2. JUSTIFICATIVA

A utilização de modelos alternativos favorece a diminuição da quantidade de animais empregados em experimentação, além de contribuir para o aprimoramento das técnicas utilizadas e possibilitar, sempre que viável, a substituição parcial ou total do uso de animais adultos, sem prejudicar a qualidade e a confiabilidade científica dos estudos realizados. Nesse contexto, a investigação de processos moleculares em embriões surge como uma abordagem relevante para a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento inicial e na resposta a agentes externos.

Os genes *Egr3*, *Bmp4* e *Hsp70* desempenham papéis fundamentais nos processos de desenvolvimento embrionário, diferenciação celular e resposta ao estresse. A proteína EGR3, um fator de transcrição rapidamente ativado por sinais extracelulares, regula genes envolvidos na proliferação celular, organização do citoesqueleto e processos de plasticidade neural. Já o BMP4, membro da família TGF- β , é essencial para a organogênese, formação tecidual e indução de linhagens celulares, como o neuroectoderma e o mesoderma. A HSP70, por sua vez, atua como uma chaperona molecular, sendo rapidamente induzida em condições de estresse celular, contribuindo para a proteção contra a apoptose, estresse oxidativo e para a manutenção da viabilidade celular durante o desenvolvimento embrionário.

Além da avaliação molecular, a análise morfológica dos embriões é um componente central na investigação da qualidade e do desenvolvimento embrionário. O sistema de Gardner, amplamente utilizado na embriologia clínica e experimental, classifica blastocistos com base em três parâmetros principais: grau de expansão, qualidade da massa celular interna (ICM) e qualidade do trofoblasto (TE). Assim, a realização da classificação morfológica tanto por meio do sistema de Gardner quanto por critérios de avaliação *in house*, por meio da observação microscópica dos embriões pertencentes a diferentes grupos experimentais, torna-se uma ferramenta importante para identificar possíveis alterações no padrão de desenvolvimento e na qualidade embrionária em resposta à exposição a diferentes compostos.

A linhagem murina C57BL/6J foi escolhida por apresentar alta similaridade genética e fisiológica com seres humanos, consolidando-se como modelo experimental amplamente utilizado em estudos de toxicologia. Essa estratégia está alinhada com o princípio dos 3 R's, contribuindo para uma pesquisa biomédica mais sustentável e comprometida com a redução do uso de animais em protocolos toxicológicos. Nesse contexto, investigar o uso desses genes como biomarcadores de embriotoxicidade representa um avanço significativo para métodos alternativos mais sensíveis, éticos e alinhados às diretrizes internacionais.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos morfológicos e moleculares da exposição aos herbicidas Prowl®H2O e Pendimetalina em embriões de *Mus musculus*, por meio da classificação de viabilidade embrionária e da análise da expressão dos genes *Bmp4*, *Egr3* e *Hsp70*.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Avaliar morfológicamente por meio das classificações *in house* e de Gardner, os embriões desde o estágio de duas células até blastocisto, após exposição a diferentes concentrações do herbicida, comparando com o grupo controle.
- 3.2.2. Apresentar a classificação morfológica realizada *in house* como uma abordagem confiável para a análise do desenvolvimento embrionário.
- 3.2.3. Avaliar se o tratamento com herbicida afeta o citoesqueleto e a proliferação celular dos embriões por meio da quantificação do gene *Egr3* em comparação com embriões controles.
- 3.2.4. Analisar se o tratamento com herbicida interfere na organogênese dos embriões por meio da quantificação do gene *Bmp4* em comparação com embriões controles.
- 3.2.5. Avaliar se a exposição aos herbicidas induz resposta ao estresse celular nos embriões por meio da quantificação da expressão do gene *Hsp70* em comparação com embriões controles.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Camundongos, machos e fêmeas, da linhagem C57BL/6J selvagens (WT), livres de patógenos especificados, entre 4 a 11 semanas de idade, foram mantidos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em condições SPF. Os animais foram alojados em mini isoladores, próprios para a espécie, medindo 32 cm de comprimento, 20 cm de largura e 21 cm de altura e receberam como cama, maravalha de *Pinus eliotti*, autoclavada, posicionados em Racks ventiladas. Os animais foram mantidos com água e ração (*Ad libitum*), ambas autoclavadas, e ciclo de claro/escuro de 12/12 horas respectivamente, em sala com controle de temperatura e umidade ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/ 55\% \pm 5\%$). A troca dos animais foi realizada semanalmente. No mini isolador a entrada de ar e a exaustão são filtradas por filtro HEPA, isolando o animal do macroambiente. Ademais, em cada mini isolador foram alojados no máximo 5 animais por gaiola. Os ensaios foram realizados com aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) pelo Protocolo CONCEA/ MCTI/ 0301052024 /PESQUISA/ 000001/ 2025 (ANEXO I).

4.2. Desenho Experimental

Para este estudo foram utilizados 6 fêmeas da linhagem C57BL/6J submetidas à superovulação com eCG (gonadotrofina coriônica equina) e hCG (gonadotrofina coriônica humana), acasaladas com machos férteis da mesma linhagem e, após confirmação por tampão vaginal, tiveram os embriões de duas células coletados e cultivados *in vitro*. Os embriões foram distribuídos em: grupo controle e grupos tratados com Pendimetalina (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Prowl®H2O (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sendo acompanhados até o estágio de blastocisto para avaliação morfológica. O ácido ribonucleico (RNA) total foi extraído dos blastocistos viáveis, depois o ácido desoxirribonucleico (DNA) complementar foi sintetizado por transcrição reversa e amplificado por reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (*Bmp4*, *Egr3* e *Hsp70*, com *Gapdh* como referência). A quantificação foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ e análise estatística por ANOVA seguida de Bonferroni ($p < 0,05$). A Figura 5 apresenta o desenho experimental esquemático, sintetizando as etapas do estudo que serão detalhadas nos tópicos subsequentes.

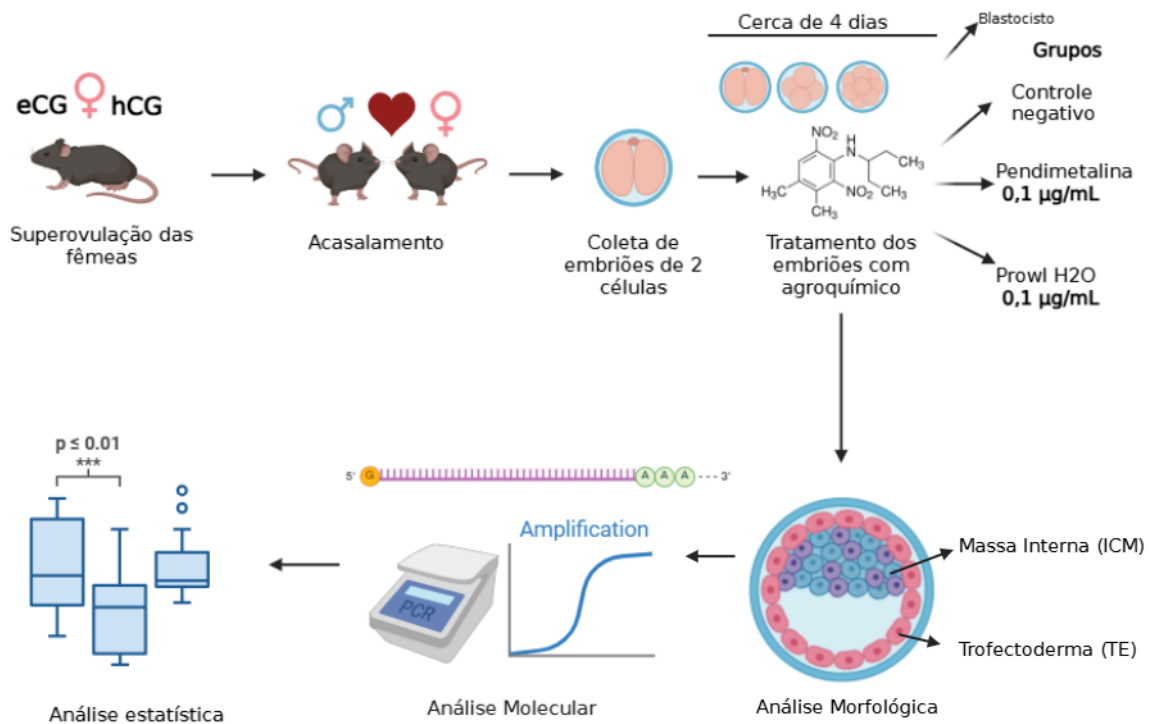


Figura 5 - Representação esquemática do desenho experimental do estudo.

Fonte: Criado com BioRender.com pelo autor (2026)

4.3. Superovulação e Coleta de Embriões

Para a superovulação e obtenção de embriões de duas células e blastocistos, 6 camundongos fêmeas C57BL/6J com 8 semanas de idade foram tratadas pela via intraperitoneal com 5 UI de eCG (Novormon; Zoetis). Após 48 horas, os mesmos foram tratados com 5 UI de hCG (Chorulon; MSD) e acasalados com machos férteis. O acasalamento foi confirmado pela presença de um tampão vaginal no 0,5 dia após a cópula.

Vinte e quatro horas após a visualização do tampão, as fêmeas foram anestesiadas com 90 mg/kg peso corpóreo de quetamina e 10 mg/kg peso corpóreo de xilazina e eutanasiadas por deslocamento cervical e, após a eutanásia, o sistema reprodutor da fêmea (útero, oviduto e ovário), foi retirado e a região do oviduto foi submetido a lavagem com meio M2, através do infundíbulo para a retiradas dos 33 embriões. Estes foram coletados e colocados em meio *FertiCult*TM para posterior utilização nos experimentos. Após isso, os embriões foram separados aleatoriamente e plaqueados em três diferentes grupos (4.4). Após os tratamentos, os embriões foram incubados em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os tratamentos foram realizados por 4 dias, tempo suficiente para o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto.

4.4. Cultura Embrionária e Tratamentos

Para a realização dos experimentos foram utilizados 33 embriões de camundongos da linhagem C57BL/6. Durante o cultivo, os embriões foram expostos a concentrações do agroquímico Prowl®H2O e Pendimetalina.

A Pendimetalina (Sigma-Aldrich, 36191 \geq 98.0 %) e Prowl®H2O (BASF, 45,5% m/v) foram previamente diluídos em etanol, de modo que a concentração final de Pendimetalina no meio de cultura, em ambos os tratamentos, fosse de 0,1 μ g/mL. As soluções foram então armazenadas a -20 °C, protegidas da luz com papel alumínio. A dosagem do Prowl® H2O foi calculada com base na concentração de pendimetalina presente na formulação comercial, garantindo equivalência na quantidade de princípio ativo em relação ao grupo tratado com pendimetalina pura. Para isso, foram preparadas soluções-estoque específicas para cada tratamento, utilizando etanol (0,1% v/v) como controle no meio de cultura.

O experimento foi estruturado em três grupos: um controle (meio de cultura + etanol) e dois grupos tratados, um com Pendimetalina (princípio ativo) e outro com Prowl®H2O (herbicida comercial), ambos na concentração final de 0,1 μ g/mL. Os grupos foram divididos em três subgrupos de 11 embriões cada. Durante o período de tratamento, os embriões foram incubados a 37°C em estufa de CO₂. Após o período de incubação, as células foram coletadas e submetidas às análises experimentais descritas nos tópicos abaixo.

4.5. Análise do Desenvolvimento/Morfologia Embrionária

Para a análise morfológica, os embriões foram monitorados diariamente para acompanhamento da progressão das fases de desenvolvimento, abrangendo os estágios de 2 a 8 células, mórula, blastocisto precoce, blastocisto expandido e blastocisto eclodido. Essa avaliação permitiu identificar possíveis alterações morfológicas decorrentes da exposição ao agroquímico. O desenvolvimento até o estágio de blastocisto foi determinado identificando a porcentagem de embriões nos estágios de duas a oito células, mórula (estrutura compacta), blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido (hérnia clara da zona pelúcida) usando um microscópio invertido (Olympus- LifeScience).

Os blastocistos foram classificados quanto ao grau de expansão da blastocèle e à qualidade da massa interna e do trofotoderma (Tabela 2 e 3), de acordo com o sistema de classificação de Gardner, o qual já foi utilizado em estudos prévios com embriões murinos, como demonstrado por Wang *et al.* (2025). Ressalta-se que, em condições *in vivo*, os graus mais avançados de expansão (4, 5 e 6) são menos frequentemente observados, uma vez que esses estágios correspondem a blastocistos expandidos, eclodindo ou já eclodidos, que

rapidamente progridem para a implantação no endométrio.

Blastocisto	Característica
1	Inicial onde a blastocele ocupa menos da metade do embrião.
2	Blastocele ocupa metade ou mais do volume do embrião.
3	Blastocele ocupa todo o volume do embrião.
4	Blastocele maior e zona pelúcida afinando
5	Em hatching com as células do trofotoderma iniciando a eclosão para fora da zona pelúcida.
6	Eclodido, o blastocisto sai completamente da zona pelúcida.

Tabela 2 - Blastocistos classificados de acordo com o grau de expansão da blastocele.

Fonte: Gardner (1999)

Massa celular interna		Trofotoderma	
Grau A	Muitas células fortemente compactadas	Grau A	Muitas células formando um epitélio coeso
Grau B	Algumas células frouxamente agrupadas	Grau B	Poucas células formando um epitélio frouxo
Grau C	Células escassas	Grau C	Células escassas

Tabela 3 - Blastocistos classificados de acordo com grau de qualidade das células.

Fonte: Gardner (1999)

O sistema de classificação de Gardner foi utilizado para discriminar os embriões quanto à viabilidade, categorizando-os em viáveis e inviáveis à continuidade do desenvolvimento embrionário. De modo geral, quanto mais elevada a classificação atribuída, maiores são as chances de implantação e de adequado desenvolvimento embrionário. Por fim, a Figura 6 ilustra os critérios morfológicos adotados para a classificação dos blastocistos.




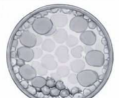
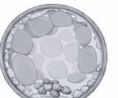

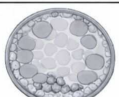
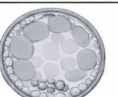
1 Blastocisto inicial cavidade <50%			
2 Blastocisto cavidade ocupa menos 50%			
3 Blastocisto cavidade completa			
	A	B	C
Massa celular interna	células numerosas e aderidas	muitas células pouco aderidas	poucas células
Trofoblasto			
Massa celular interna	muitas células organizadas	muitas células pouco organizadas	poucas células
	A	B	C

Figura 6 - Representação da classificação morfológica de blastocistos de acordo com o sistema de Gardner até o grau de expansão da blastocele número 3.

Fonte: Pronúcleo (2020).

Com base nesse resultado qualitativo, aplicou-se adicionalmente um critério objetivo e quantitativo para categorizar a qualidade global de cada grupo em cinco níveis (péssimo, ruim, regular, bom e excelente), possibilitando uma avaliação padronizada do desempenho embrionário entre os grupos experimentais. Essa classificação, previamente estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa (Tabela 4), fundamenta-se no número de embriões considerados viáveis em cada grupo. Assim, quanto maior o quantitativo de embriões viáveis obtidos, mais elevada foi a classificação atribuída ao respectivo grupo.

Número de embriões viáveis	Classificação final do grupo
0 a 1 embriões	Péssimo
2 a 4 embriões	Ruim
5 a 7 embriões	Regular
8 a 10 embriões	Bom
11 embriões	Excelente

Tabela 4 - Classificação *in house* do grupo de pesquisa de acordo com a viabilidade dos embriões

Fonte: Elaboração própria a partir de classificação utilizada pelo grupo de pesquisa (2026).

4.6. Análise Molecular dos Embriões

As análises de expressão gênica foram realizadas em embriões que chegaram à fase de blastocisto. Para isso foi realizada a extração de RNA total usando Trizol (IVT), com protocolo específico para amostras de pequena quantidade. As concentrações de RNA foram mensuradas no equipamento NanoDrop (1000, Thermo). Em seguida, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA por transcrição reversa utilizando o ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) de acordo com as especificações do fabricante e realizada no termociclador (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, EUA). A reação de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi realizada no equipamento ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em duplicata, usando iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). A expressão do genes *Bmp4*, *Egr3* e *Hsp70*, utilizando glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) como gene de referência, foi analisada por meio de primers específicos para cada alvo conforme descrito na Tabela 5.

Gene	Organismo	Sequência dos primers	Tamanho do amplicon (pb)
<i>Bmp4</i>	<i>Mus musculus</i>	F: GCT TCT GCA GGA ACC AAT GGA R: TCC ATT GGT TCC TGC AGA AGC	21
<i>Egr3</i>	<i>Mus musculus</i>	F: TGA CCA ACG AGA AGC CCA ATC R: TCG CCG CAG TTG GAA TAA GG	280
<i>Hsp70</i>	<i>Mus musculus</i>	F: CAT CAT CAG TGG GCT GTA CCA R: GTG CCC AAG CAG CTA CTC AAG	184
<i>Gapdh</i>	<i>Mus musculus</i>	F: TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC R: GG ATG CAG GGA TGA TGT TCT	176

Tabela 5. Sequência dos primers utilizados para análise da expressão gênica de xxxx em *Mus musculus* por RT-qPCR.

Fonte: Própria (2025).

Os primers foram avaliados no Primer-BLAST para verificação de especificidade e ausência da indicação “*predicted*”, assegurando correspondência com sequências de mRNA. No *Nucleotide BLAST*, confirmou-se a correspondência com o gene e organismo de interesse (*E-value* < 1 e identidade de 100%). As propriedades físico-químicas foram avaliadas com o *Oligonucleotide Properties Calculator*, garantindo temperatura de melting entre 35 °C e 65 °C, baixa auto complementaridade e diferença máxima de 2 °C entre os primers. A análise

quantitativa permitiu a comparação dos níveis de expressão gênica entre os embriões expostos aos agroquímicos e os embriões controle, possibilitando avaliar os efeitos moleculares da exposição durante o desenvolvimento embrionário.

4.7. Interpretação dos Dados

A expressão relativa dos genes *Bmp4*, *Egr3* e *Hsp70* foi avaliada por meio da técnica de RT-qPCR, a partir da qual foram obtidos os valores de Ct (*Cycle threshold*) utilizados nas análises. Inicialmente, os valores de Ct do gene de interesse foram normalizados em relação ao gene endógeno constitutivo (*Gapdh*) por meio do cálculo do ΔCt (Ct gene alvo – Ct gene referência), a fim de corrigir variações na quantidade de RNA inicial e na eficiência da síntese de cDNA. Em seguida, calculou-se o $\Delta\Delta Ct$ a partir da diferença entre o ΔCt do grupo experimental e o ΔCt do grupo controle (G1), utilizado como referência. Por fim, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para determinar a variação relativa da expressão relativa entre os grupos, também denominado *fold change* (FC).

Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). As análises entre os grupos foram realizadas pelos testes de *One-way ANOVA* utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A porcentagem de sobrevivência de embriões foi estimada usando o método de Kaplan-Meier, seguido pela comparação das curvas de sobrevivência através do teste de log-rank - Mantel-Cox.

5. RESULTADOS

5.1 Análise Morfológica

Ao longo do cultivo *in vitro*, os embriões foram acompanhados diariamente, o que permitiu observar de forma contínua a progressão dos estágios de desenvolvimento embrionário, desde as fases iniciais de 2 a 8 células até os estágios de mórula, blastocisto precoce, blastocisto expandido e blastocisto eclodido. Esse acompanhamento possibilitou a identificação de alterações tanto no ritmo de desenvolvimento quanto na morfologia embrionária, associadas à exposição aos herbicidas.

Durante o período de cultivo, foram observados sinais evidentes de degeneração embrionária, caracterizados por atraso no desenvolvimento em relação aos demais embriões do grupo, presença de vacúolos citoplasmáticos, divisão dos blastômeros em tamanhos desiguais e fragmentações celulares. Essas alterações morfológicas indicam comprometimento da qualidade e do potencial de desenvolvimento embrionário (Figura 7).

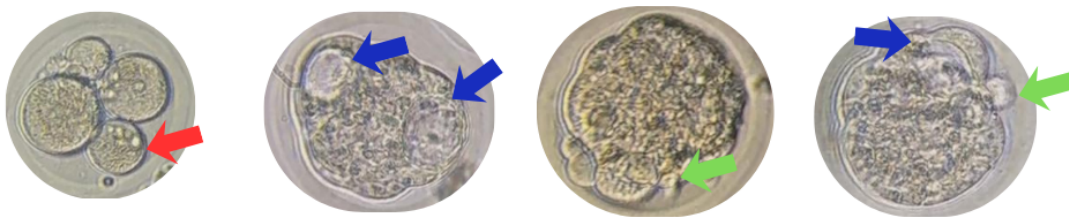
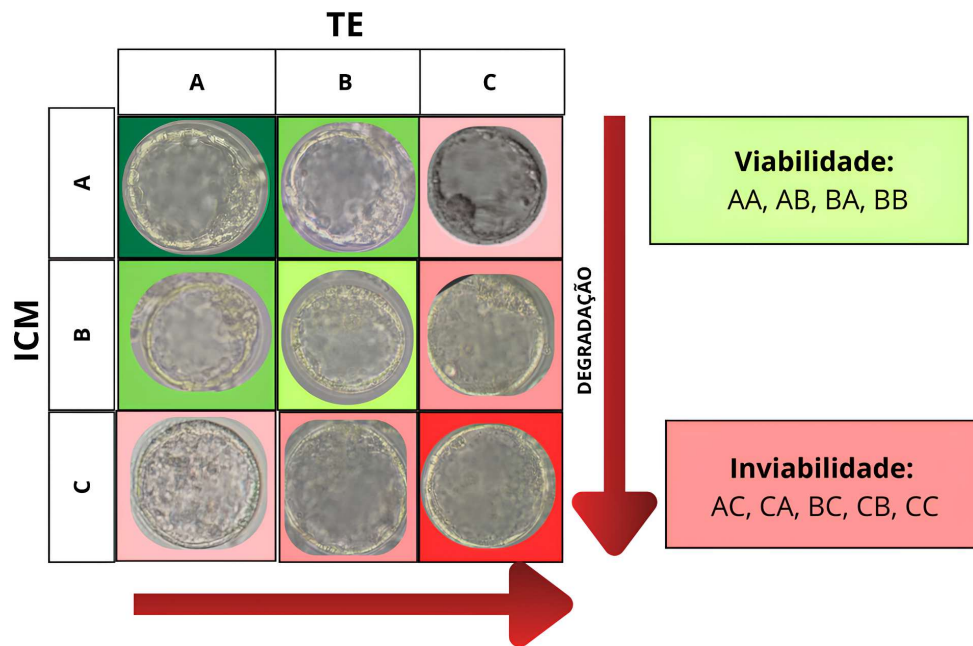


Figura 7 - Alterações morfológicas indicativas de degeneração em embriões C57BL/6J. Setas vermelhas indicam divisão desigual dos blastômeros, setas azuis indicam vacuolização citoplasmática e setas verdes indicam fragmentação celular.

Observou-se maior incidência de fragmentação celular e presença de vacúolos citoplasmáticos nos embriões pertencentes ao grupo tratado com Prowl® H2O, indicando alterações morfológicas associadas ao comprometimento da qualidade embrionária. Embora graus leves de fragmentação e discretas diferenças no tamanho dos blastômeros possam ser observados no desenvolvimento embrionário *in vitro*, quando presentes de forma significativa, a fragmentação celular e a assimetria entre blastômeros podem comprometer a viabilidade embrionária e reduzir o potencial de desenvolvimento e implantação.

Os embriões que atingiram o estágio de blastocisto foram avaliados quanto à viabilidade com base na classificação de Gardner, considerando os critérios morfológicos da Massa Interna (ICM) e Trofoectoderma (TE) (Figura 8).

(A)



(B)

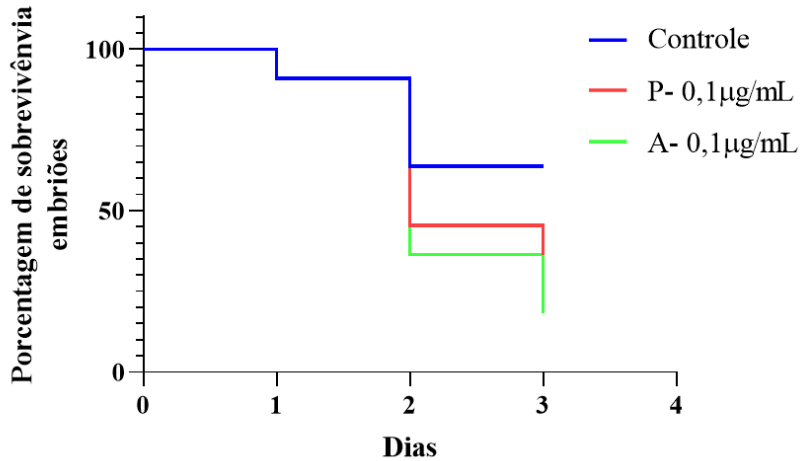


Figura 8 - Classificação morfológica e viabilidade embrionária de embriões C57BL/6J.

(A) Ilustração esquemática da classificação de blastocistos grau 3 de acordo com a qualidade da Massa Celular Interna (ICM) e do Trofoectoderma (TE), utilizada para avaliação da viabilidade embrionária. (B) A análise de sobrevivência foi realizada pelo método de Kaplan–Meier, seguida pela comparação das curvas por meio do teste de log-rank (Mantel–Cox).

Após a classificação morfológica, a contagem de embriões viáveis permitiu o enquadramento dos grupos avaliados na classificação *in house* nas categorias péssimo, ruim, regular, bom ou excelente, conforme os dias de desenvolvimento embrionário (Figura 9).

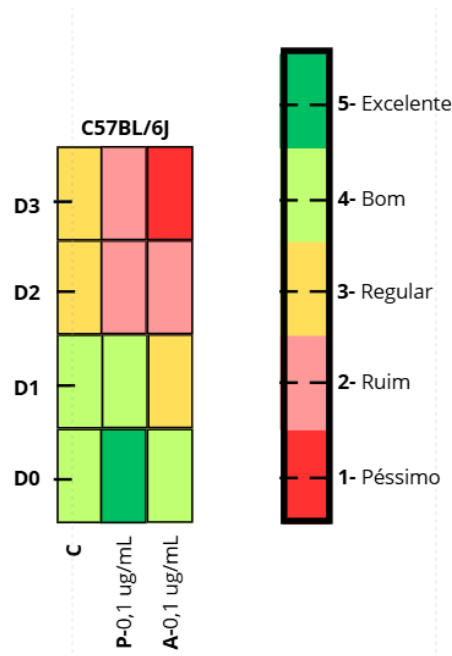


Figura 9 - Gráfico da classificação dos embriões de C57BL/6J de acordo com a quantidade de embriões viáveis dos grupos: controle, Pendimetalina (P) e Prowl®H2O (A).

Observou-se uma redução na qualidade embrionária nos grupos expostos aos herbicidas em comparação ao grupo controle. Esse efeito se intensifica ao longo do desenvolvimento, tornando-se mais evidente no terceiro dia (D3).

5.2 Análise Molecular e Estatística

A realização da análise molecular dos embriões demonstrou alterações significativas na expressão em todos os genes estudados em relação ao controle. Para melhor estruturação dos gráficos, os embriões foram distribuídos nos grupos controle (G1), Pendimetalina (G2) e Prowl® H2O (G3).

5.2.1 *Bmp4*

Os resultados da RT-qPCR mostraram que a expressão de *Bmp4* foi semelhante entre o grupo controle e o grupo tratado com Pendimetalina, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre eles. Por outro lado, os embriões expostos ao Prowl® H2O apresentaram um aumento significativo na expressão relativa de *Bmp4* em comparação ao grupo controle, conforme indicado na Figura 10. Alterações na expressão de *Bmp4*

durante o período pré-implantacional podem impactar processos como proliferação celular, diferenciação e organização embrionária.

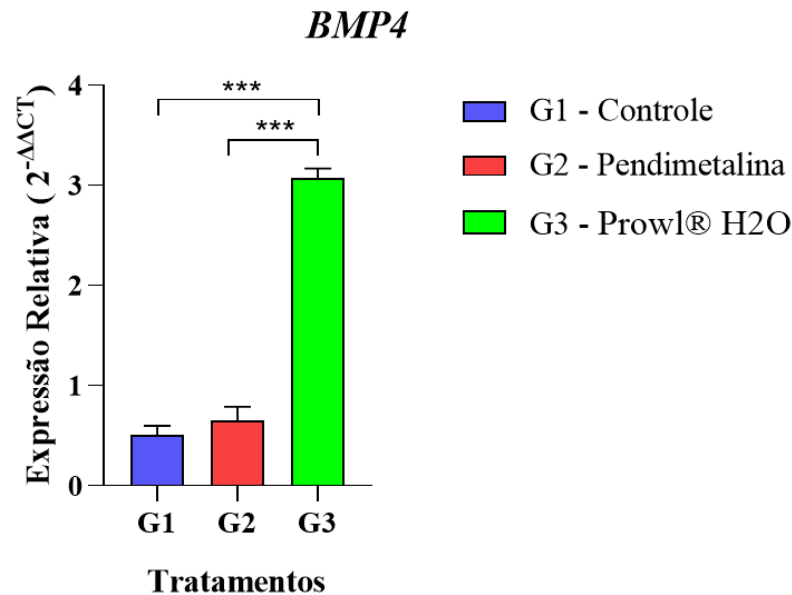


Figura 10 - Expressão relativa do gene *Bmp4* em embriões C57BL/6J dos grupos controle (G1), Pendimetalina (G2) e Prowl®H2O (G3). A expressão gênica foi determinada por RT-qPCR e normalizada pelo gene de referência *Gapdh*. A quantificação foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, e a análise estatística conduzida por ANOVA, seguida do teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). Diferenças significativas foram observadas entre G1 e G3 ($p = 0,0005$) e entre G2 e G3 ($p = 0,0006$), enquanto não foi observada diferença significativa entre G1 e G2 ($p = 0,7764$).

5.2.2 *Egr3*

Em relação ao *Egr3*, gene associado à resposta a estímulos ambientais, à regulação da proliferação celular e aos processos de diferenciação, observou-se um aumento significativo da expressão relativa nos grupos tratados com Pendimetalina (G2) e Prowl®H2O (G3) quando comparados ao grupo controle (Figura 11). O maior nível de expressão foi identificado no grupo G2, indicando uma resposta mais intensa à exposição ao princípio ativo isolado. O grupo G3 também apresentou elevação significativa da expressão, porém em menor magnitude em relação ao G2. Esses resultados sugerem que a exposição aos herbicidas induz a ativação de vias de resposta celular mediadas por *Egr3*, possivelmente relacionadas a mecanismos de estresse celular e alterações nos processos de proliferação e diferenciação embrionária.

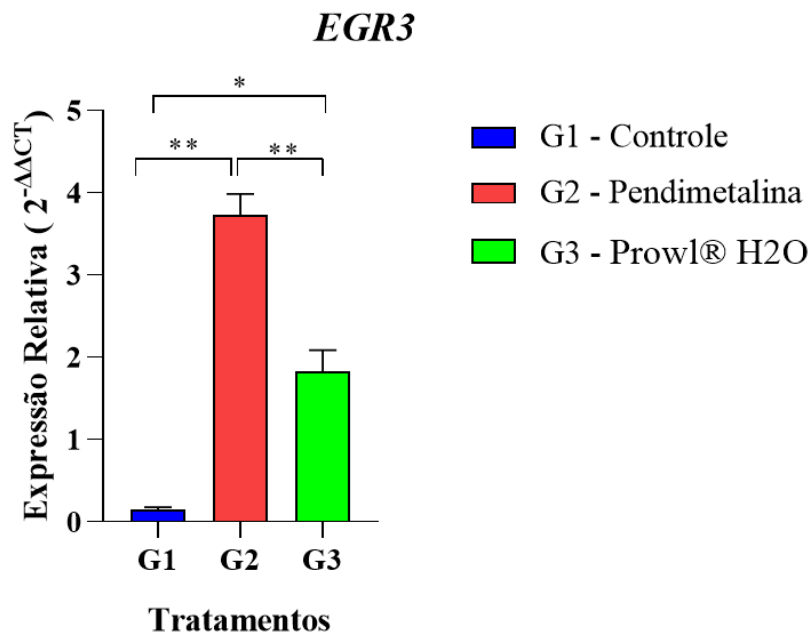


Figura 11 - Expressão relativa do gene *Egr3* em embriões C57BL/6J dos grupos controle (G1), Pendimetalina (G2) e Prowl®H2O (G3). A expressão gênica foi determinada por RT-qPCR e normalizada pelo gene de referência *Gapdh*. A quantificação foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, e a análise estatística conduzida por ANOVA, seguida do teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). Diferenças significativas foram observadas entre G1 e G2 ($p = 0,0014$), entre G1 e G3 ($p = 0,0131$) e entre G2 e G3 ($p = 0,0091$).

5.2.3 *Hsp70*

Para o *Hsp70*, gene diretamente envolvido na resposta ao estresse celular e na proteção das células contra danos, observou-se um aumento significativo da expressão nos embriões tratados com Pendimetalina (G2) quando comparado ao grupo controle (G1) e ao grupo tratado com Prowl®H2O (G3) (Figura 12).

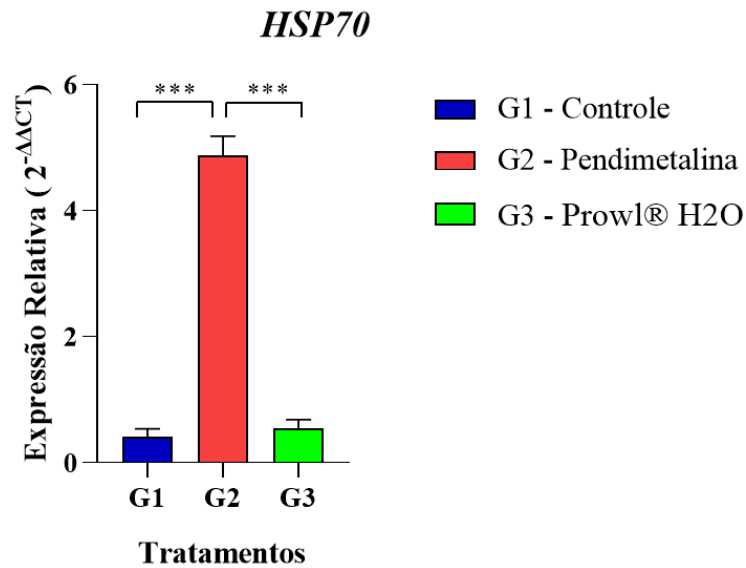


Figura 12 - Expressão relativa do gene *Hsp70* em embriões C57BL/6J dos grupos controle (G1), Pendimetalina (G2) e Prowl®H2O (G3). A expressão gênica foi determinada por RT-qPCR e normalizada pelo gene de referência *Gapdh*. A quantificação foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, e a análise estatística conduzida por ANOVA, seguida do teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). Diferenças significativas foram observadas entre G1 e G2 ($p = 0,0007$) e entre G2 e G3 ($p = 0,0008$), não sendo observada diferença significativa entre G1 e G3 ($p > 0,9999$).

De forma geral, a análise da expressão gênica revelou alterações significativas nos três genes avaliados em relação ao grupo controle, ainda que com padrões distintos entre os tratamentos. Observou-se aumento significativo da expressão de *Hsp70* nos embriões expostos à pendimetalina, enquanto o gene *Egr3* apresentou aumento em ambos os tratamentos, com diferenças significativas entre eles. Por sua vez, o gene *Bmp4* demonstrou aumento significativo nos embriões expostos ao Prowl®H2O, não sendo observadas alterações relevantes no grupo tratado com Pendimetalina em relação ao controle.

A elevação da expressão de genes associados à resposta ao estresse celular, à adaptação a estímulos ambientais e à regulação de processos de desenvolvimento sugere que a exposição aos herbicidas desencadeia alterações moleculares relevantes durante o desenvolvimento embrionário. Esses achados reforçam a sensibilidade do período embrionário às substâncias testadas e indicam que as mudanças observadas em nível molecular acompanham as alterações morfológicas identificadas ao longo do cultivo *in vitro*.

6. DISCUSSÃO

Estudos experimentais utilizando modelos murinos demonstram que a exposição a herbicidas é capaz de modular a expressão de genes envolvidos em respostas ao estresse celular, processos inflamatórios, ativação neuronal e vias regulatórias, indicando que essas substâncias podem desencadear alterações moleculares relevantes em diferentes tecidos e fases do desenvolvimento (Liu, Y. *et al.*, 2023). Nesse sentido, o embrião e modelos embrionários têm sido cada vez mais reconhecidos como sistemas sensíveis para a avaliação de toxicidade, especialmente durante as fases iniciais do desenvolvimento, porque permitem identificar respostas moleculares e efeitos adversos precocemente em níveis celulares e genéticos (Niethammer *et al.*, 2022).

Dentro desse contexto, a redução no número de embriões viáveis e as deficiências morfológicas observadas, como a presença de Massa Celular Interna (ICM) ou Trofoectoderma (TE) delgados, podem estar relacionadas ao desequilíbrio na expressão de *Bmp4* (Li *et al.*, 2024). Uma vez que este gene é um regulador crítico da diferenciação entre as linhagens de ICM e TE, sua superexpressão pode ter induzido uma falha na alocação celular durante a transição de mórula para blastocisto, resultando em estruturas teciduais hipoplásicas e funcionalmente comprometidas. O que contribui para a menor viabilidade embrionária observada, especialmente no grupo exposto ao Prowl®H2O no dia D3, que apresentou a pior classificação morfológica.

Além disso, as alterações morfológicas, como a presença marcante de vacúolos citoplasmáticos e sinais de degeneração celular nos grupos tratados, encontra respaldo molecular na ativação de *Hsp70* e *Egr3*. O aumento desses marcadores indica que a homeostase proteica foi severamente desafiada pela exposição aos herbicidas. Quando a capacidade de reparo mediada pelas chaperonas (*Hsp70*) é superada pelo estresse químico persistente, o embrião desencadeia processos de autofagia e fragmentação celular como tentativa de isolar o dano, o que se manifesta morfológicamente através da vacuolização e, em última instância, na interrupção do desenvolvimento e perda da viabilidade embrionária (Giglio, 2022).

Adicionalmente, diferentemente de uma simples inibição do desenvolvimento, a superexpressão de *Bmp4* sugere que a exposição aos agroquímicos foi capaz de desregular vias de sinalização essenciais ao desenvolvimento embrionário precoce. O *Bmp4* é um gene chave da superfamília TGF- β , cuja expressão é controlada durante a embriogênese. Níveis adequados de *Bmp4* são necessários para a correta organização do eixo embrionário e diferenciação celular. No entanto, alterações quantitativas em sua expressão podem ser tão

prejudiciais quanto sua redução, levando a erros de padronização tecidual e defeitos no desenvolvimento. Portanto, a superexpressão de *Bmp4* observada neste trabalho não deve ser interpretada como um efeito adaptativo benéfico, mas sim como um indicador precoce de desregulação molecular em um estágio crítico do desenvolvimento embrionário (Li *et al.*, 2024).

Os resultados obtidos indicam que houve maior expressão de *Bmp4* no grupo tratado com o herbicida comercial, quando comparado aos demais grupos. Essa diferença pode estar relacionada ao fato de o Prowl®H2O ser uma formulação comercial, composta não apenas pelo princípio ativo Pendimetalina, mas também por adjuvantes e surfactantes que podem modificar a biodisponibilidade e intensificar a resposta biológica. Estudos comparativos como os de Mesnage *et al.* (2019) e Martins *et al.* (2022) demonstram que formulações comerciais de herbicidas frequentemente apresentam toxicidade superior àquela observada com o princípio ativo isolado, sendo esse efeito muitas vezes atribuído à presença de co-formulantes que contribuem para o estresse celular e potencializam a desregulação gênica.

No que se refere ao gene *Egr3*, pertencente à família *Early Growth Response* (EGR), destaca-se seu papel como gene de resposta imediata, rapidamente ativado frente a estímulos ambientais e condições de estresse celular. A indução de genes da família EGR está diretamente relacionada à regulação de processos celulares fundamentais, como proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Shin *et al.*, 2014). O estudo Da Gama Silva *et al.*, 2000 demonstra que o estresse celular também culmina em um aumento na fosforilação da proteína EGR-1, da família EGR, assim como o *Egr3*, e em sua atividade de ligação ao DNA. Nesse contexto, a elevação da expressão de *Egr3* observada neste estudo sugere a ativação de vias de sinalização associadas à resposta ao estresse embrionário.

De maneira complementar, evidências indicam que a desregulação de genes da família *Egr* pode interferir nos mecanismos de controle da divisão celular, alterando o equilíbrio entre proliferação e morte celular programada, o que pode resultar em comprometimento do desenvolvimento normal (Sakamoto *et al.*, 1992). De fato, tais efeitos são consistentes com as alterações morfológicas observadas neste estudo, nas quais foram identificadas anormalidades compatíveis com prejuízos no desenvolvimento embrionário.

Paralelamente, o gene *Hsp70* é amplamente reconhecido como um marcador molecular da resposta ao estresse celular, sendo fortemente regulado em condições adversas, incluindo exposição a agentes químicos e outros estressores ambientais, e sua superexpressão está associada à manutenção da homeostase proteica sob condições estressantes (Evgen'ev *et al.*, 2023). Nesse contexto, o aumento da expressão de *Hsp70* observado neste estudo sugere a

ativação de vias de resposta ao estresse embrionário induzidas pela exposição aos herbicidas. Evidências da literatura, como o do estudo de Morimoto *et al.* (1998), indicam que, embora a indução de *Hsp70* represente uma tentativa de proteção celular, sua expressão exacerbada pode refletir um estado de estresse persistente, capaz de interferir em processos essenciais do desenvolvimento, como a progressão do ciclo celular e a sobrevivência celular, podendo contribuir para alterações morfológicas e redução da viabilidade embrionária. Esse aumento de expressão pode estar diretamente relacionado às alterações morfológicas observadas, incluindo vacuolização citoplasmática, fragmentação celular e divisão irregular dos blastômeros, uma vez que tais alterações são comumente associadas a distúrbios na homeostase proteica e ao comprometimento da viabilidade celular (Morimoto *et al.*, 1998).

Essa divergência nos perfis de expressão sugere que o princípio ativo isolado e a formulação comercial podem atuar por mecanismos toxicológicos distintos no microambiente embrionário (Martins *et al.* 2022). Enquanto a Pendimetalina pura parece exercer um efeito primordialmente estressor e citotóxico, evidenciado pela robusta ativação de genes de resposta imediata e de proteção térmica (*Egr3* e *Hsp70*), o Prowl®H2O demonstra um potencial teratogênico mais acentuado. A superexpressão de *Bmp4* no grupo exposto ao formulado indica que a presença de adjuvantes não apenas facilita a entrada do herbicida na célula, mas interfere diretamente em vias de sinalização morfogenética (Li *et al.*, 2024).

Por fim, a toxicidade da Pendimetalina já foi previamente investigada em diferentes modelos experimentais, incluindo roedores e vertebrados aquáticos, evidenciando seu potencial de interferência em processos celulares fundamentais ao desenvolvimento embrionário. Estudos em embriões de *Danio rerio* demonstram que a exposição à Pendimetalina compromete a atividade da cadeia transportadora de elétrons (ETC) e a bioenergética mitocondrial, resultando em defeitos integrados durante a embriogênese (Park *et al.*, 2021). Corroborando esses achados, Byrnes *et al.* (2018) demonstraram que a disfunção mitocondrial em embriões está associada a atraso no desenvolvimento, alterações neurológicas, defeitos cardíacos e redução da taxa de sobrevivência.

Com isso, os resultados observados no presente estudo com embriões de *Mus musculus* sugerem que a exposição à Pendimetalina pode induzir efeitos semelhantes aos descritos em modelos aquáticos. Reforçando a relevância da utilização de modelos alternativos em estudos de toxicologia, especialmente aqueles capazes de detectar alterações moleculares e morfológicas precoces durante fases críticas do desenvolvimento para avaliação de toxicidade reprodutiva como o do presente estudo.

7. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a exposição *in vitro* de embriões de *Mus musculus* aos herbicidas Pendimetalina e Prowl®H2O foi capaz de induzir alterações morfológicas e moleculares durante o desenvolvimento embrionário inicial. Observou-se aumento na expressão dos genes *Bmp4*, *Egr3* e *Hsp70*, com padrões distintos entre os tratamentos, sugerindo a ativação de vias celulares associadas à resposta ao estresse e à regulação do desenvolvimento embrionário. Especificamente, o gene *Bmp4* apresentou maior expressão no grupo exposto ao Prowl®H2O, enquanto os genes *Egr3* e *Hsp70* exibiram maior magnitude de expressão no grupo tratado com Pendimetalina. Em conjunto, esses achados sugerem que diferentes formulações do herbicida são capazes de desencadear respostas biológicas distintas no microambiente embrionário.

Esses resultados reforçam o potencial desses genes como biomarcadores de toxicidade embrionária e evidenciam a importância de avaliar não apenas o princípio ativo isolado, mas também as formulações comerciais. Além disso, os achados deste estudo destacam a relevância do uso de métodos alternativos na pesquisa científica, contribuindo para a redução do uso de animais, em consonância com os princípios dos 3R's, especialmente por meio da utilização de modelos embrionários sensíveis para a detecção precoce de alterações moleculares e morfológicas. Embora ainda sejam necessários estudos adicionais para aprofundar a compreensão dos mecanismos envolvidos e dos possíveis efeitos a longo prazo, os resultados reforçam a importância de avaliar não apenas o princípio ativo isolado, mas também as formulações comerciais utilizadas na prática. Assim, este trabalho contribui para ampliar o entendimento sobre os impactos da exposição a herbicidas no desenvolvimento embrionário de camundongos C57BL/6J, evidenciando a importância da integração entre análises morfológicas e moleculares em estudos toxicológicos, bem como do avanço de abordagens metodológicas mais éticas e eficientes.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. I. *et al.* Pendimethalin-induced oxidative stress, DNA damage and activation of anti-inflammatory and apoptotic markers in male rats. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 17139, 2018.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografias autorizadas P05**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/p/4464json-file-1>. Acesso em: 26 nov. 2025.
- BASF S.A. **Prowl®H2O**: herbicida. São Paulo: BASF S.A., 2025. Bula de herbicida. Disponível em: <https://agriculture.basf.com/br/pt/protecao-de-cultivos-e-sementes/produtos/Prowl®H2OI-h2O#layout-601036407>. Acesso em: 26 nov. 2025.
- BRESCHI, A.; GINGERAS, T. R.; GUIGÓ, R. Comparative transcriptomics in human and mouse. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 425–440, 2017.
- BRYANT, C. D. The blessings and curses of C57BL/6 substrains in mouse genetic studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1245, n. 1, p. 31–33, 2011.
- CAI, J. *et al.* Day-3-embryo fragmentation is associated with singleton birth weight following fresh single blastocyst transfer: A retrospective study. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 13, p. 919283, 2022.
- CAMPITELLI, Laura Maria Mendes. **Uso de embriões em testes de toxicidade de herbicidas, uma revisão abrangente**. 2025. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2025.
- CANALES, C. P.; WALZ, K. The mouse, a model organism for biomedical research. *In: Cellular and Animal Models in Human Genomics Research*. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 119–140.
- CASCI, Tanita. Mice and men measure up. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 495, 2002.
- CHANG, M. C. J.; GRIEDER, F. B. The continued importance of animals in biomedical research. **Lab Animal**, [s. l.], v. 53, n. 11, p. 295–297, 2024.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, p. 11–23, 2007.
- COLE, A. E.; MURRAY, S. S.; XIAO, J. Bone morphogenetic protein 4 signalling in neural stem and progenitor cells during development and after injury. **Stem Cells International**, [s. l.], v. 2016, p. 9260592, 2016.
- DA GAMA SILVA, Patrícia Nogueira. **A expressão do gene de resposta precoce ao crescimento (EGR-1) após infecção pelo vírus Vaccinia**. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/items/72cb8d2e-ae27-445e-a756-c326f32a5974>. Acesso em: 26 fev. 2026.

ESFANDIARI, Navid; GUBISTA, Ashley. Mouse embryo assay for human in vitro fertilization quality control: a fresh look. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [s. l.], v. 37, p. 1123–1127, 2020.

EVGEN'EV, Michael B. *et al.* The role of Hsp70 in adaptation to adverse conditions and its possible medical application. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 25, 2023.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, [s. l.], v. 61, p. 243–282, 1999.

FERGUSON, Scarlett; MESNAGE, Robin; ANTONIOU, Michael N. Cytotoxicity mechanisms of eight major herbicide active ingredients in comparison to their commercial formulations. **Toxics**, Basel, v. 10, n. 11, p. 711, 2022.

GARDNER, D. K. *et al.* **Textbook of assisted reproductive techniques**: Volume 1: Laboratory perspectives. Boca Raton: CRC Press, 2023.

GARDNER, D. K. *et al.* Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 73, n. 6, p. 1155–1158, 2000.

GIGLIO, A.; VOMMARIO, M. L. Dinitroaniline herbicides: a comprehensive review of toxicity and side effects on animal non-target organisms. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 29, n. 51, p. 76687–76711, 2022.

GUIMARÃES, M. V.; FREIRE, J. E. DA C.; MENEZES, L. M. B. DE. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Revista Bioética**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 217–224, 2016.

ISAQUE, E. **Gametogênese animal**: espermatogênese e ovogênese. [S. l.]: PhilArchive, 2018. Disponível em: <https://philarchive.org/rec/DASGAE>. Acesso em: 26 fev. 2026.

KLEIN, S. G. *et al.* A simple and low-cost environmental enrichment program improves the welfare of *Calomys callosus*, a species that adapts to animal facilities. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 11, p. 1436907, 2024.

LEE, Jae-Seon; SEO, Jeong-Sun. Differential expression of two stress-inducible Hsp70 genes by various stressors. **Experimental & Molecular Medicine**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 131–136, 2002.

LEE, Sun-Min; SURANI, M. Azim. Epigenetic reprogramming in mouse and human primordial germ cells. **Experimental & Molecular Medicine**, [s. l.], v. 56, n. 12, p. 2578–2587, 2024.

LEONELLI, S.; ANKENY, R. A. What makes a model organism? **Endeavour**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 209–212, 2013.

LI, Baige *et al.* Overexpression of Bmp4 induces microphthalmia by disrupting embryonic neural retina. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 201, p. 106654, 2024.

- LI, Xiao-Hong *et al.* Hsp70 overexpression may play a protective role in the mouse embryos stimulated by CUMS. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 125, 2015.
- LIU, Mengling *et al.* Maternal exposure to a glyphosate-based herbicide impairs placental development through endoplasmic reticulum stress in mice. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 173, p. 113640, 2023.
- LÖNN, P. *et al.* BMP enhances transcriptional responses to NGF during PC12 cell differentiation. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 30, n. 6–7, p. 753–765, 2005.
- MALMSTEN, J. *et al.* Automated cell division classification in early mouse and human embryos using convolutional neural networks. **Neural Computing & Applications**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 2217–2228, 2021.
- MENDES, Mariana Peluci Garcia; SOUZA, Cristina Aparecida de Jesus. Aplicação de modelos animais na pesquisa biomédica experimental. **Revista de Saúde da Faciplac**, Brasília, v. 4, n. 2, jul./dez. 2017.
- MOLÈ, M. A.; WEBERLING, A.; ZERNICKA-GOETZ, M. Comparative analysis of human and mouse development: From zygote to pre-gastrulation. **Current Topics in Developmental Biology**, [s. l.], v. 136, p. 113–138, 2020.
- MORIMOTO, R. I.; SANTORO, M. G. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 833–838, 1998.
- NASIRI, N.; EFTEKHARI-YAZDI, P. An overview of the available methods for morphological scoring of pre-implantation embryos in in vitro fertilization. **Cell Journal**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 392–405, 2015.
- NIETHAMMER, Mirjam *et al.* In vitro models of human development and their potential application in developmental toxicity testing. **Development**, [s. l.], v. 149, n. 20, 2022.
- NIKOU, Nikoleta; LÓPEZ PANADÉS, Maria; ROIG, Ignasi. Histological and cytological techniques to study perinatal mouse ovaries and oocytes. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 2770, p. 151–170, 2024.
- NOWOTSCHIN, S.; HADJANTONAKIS, A.-K.; CAMPBELL, K. The endoderm: a divergent cell lineage with many commonalities. **Development**, [s. l.], v. 146, n. 11, p. dev150920, 2019.
- OH, S. Y. *et al.* In vitro embryogenesis and gastrulation using stem cells in mice and humans. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 17, p. 13655, 2023.
- OLIVEIRA FERNANDES, M.; TOURTELLOTTE, W. G. Egr3-dependent muscle spindle stretch receptor intrafusal muscle fiber differentiation and fusimotor innervation homeostasis. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 14, p. 5566–5578, 2015.
- PARK, H. *et al.* Assessment of the in vivo genotoxicity of pendimethalin via mitochondrial bioenergetics and transcriptional profiles during embryogenesis in zebrafish. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 411, p. 125153, 2021.

PATHAK, V. M. *et al.* Current status of pesticide effects on environment, human health and its eco-friendly management as bioremediation: a comprehensive review. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 13, p. 962619, 2022.

PEDERSEN, R. A.; WU, K.; BAŁAKIER, H. Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 117, n. 2, p. 581–595, 1986.

PEDRO, D. Métodos alternativos ao uso de animais em ensino e pesquisa: evolução e panorama atual do Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 18, n. 37, 2021.

PISKO, J. *et al.* Apoptotic cells in mouse blastocysts are eliminated by neighbouring blastomeres. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 9228, 2021.

POSFAI, E. *et al.* All models are wrong, but some are useful: establishing standards for stem cell-based embryo models. **Stem Cell Reports**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 1117–1141, 2021.

PRIOR, H. *et al.* Reflections on the progress towards non-animal methods for acute toxicity testing of chemicals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 102, p. 30–33, 2019.

RACOWSKY, C. *et al.* Standardization of grading embryo morphology. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 1152–1153, 2010.

ROBERTS, R. M. *et al.* The role of Bmp4 signaling in trophoblast emergence from pluripotency. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 79, n. 8, p. 447, 2022.

ROSENZWEIG, Rina *et al.* The Hsp70 chaperone network. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 665–680, 2019.

SAITOU, M. Mammalian germ cell development: From mechanism to in vitro reconstitution. **Stem Cell Reports**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 669–680, 2021.

SAKAMOTO, K. M. *et al.* HTLV-I and HTLV-II tax trans-activate the human EGR-1 promoter through different cis-acting sequences. **Oncogene**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 2125–2130, 1992.

SANTORO, M. **Agroquímicos**: importância, problemas e alternativas. [S. l.]: Blog Aegro, 2023. Disponível em: <https://blog.aegro.com.br/agroquimicos/>. Acesso em: 26 fev. 2026.

SANTOS, D.; EMERICH, L. **Embriotoxicidade induzida por disruptores químicos**: Modelo de exposição in ovo. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/250482>. Acesso em: 26 fev. 2026.

SHECAIRA, T. P. *et al.* O Uso De Animais Na Pesquisa Científica: Um Olhar Para A Ética. **Colloquium: Health and Education**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. e014, 2021.

SHIN, H. *et al.* The transcription factor Egr3 is a putative component of the microtubule organizing center in mouse oocytes. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e94708, 2014.

SILVA, R. B. DA; SILVA, T. T. DA. Princípio dos 3R como ética mínima na experimentação animal. **Revista Bioética**, Brasília, v. 32, p. 794, 2024.

SOGORB, M. A. *et al.* An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 230, n. 2, p. 356–367, 2014.

TANNENBAUM, J.; BENNETT, B. T. Russell and Burch's 3 R's then and now: the need for clarity in definition and purpose. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 120–132, 2015.

TOURTELLOTTE, W. G. *et al.* The transcription factor Egr3 modulates sensory axon-myotube interactions during muscle spindle morphogenesis. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 232, n. 2, p. 388–399, 2001.

VAN DE MERWE, Jason P. *et al.* In vitro bioassays reveal that additives are significant contributors to the toxicity of commercial household pesticides. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 199, p. 263–268, 2018.

VAN SOOM, A. *et al.* Alternative models for the study of embryo-maternal cross-talk and signaling molecules from fertilisation to implantation. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. iii–v, 2011.

VASCONCELLOS, M. A. “Crise de Reprodutibilidade” como agente de mudança do paradigma da pesquisa pré-clínica. **Revista da Faculdade de Medicina de Teresópolis**, Teresópolis, v. 3, n. 2, 2019.

WANG, F. *et al.* Label-free evaluation of mouse embryo quality using time-lapse bright field and optical coherence microscopy. **Communications Biology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 612, 2025.

WANG, S. *et al.* Assessing sub-lethal effects of the dinitroaniline herbicide pendimethalin in zebrafish embryos/larvae (*Danio rerio*). **Neurotoxicology and Teratology**, [s. l.], v. 89, p. 107051, 2022.

WINNIER, G. *et al.* Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. **Genes & Development**, [s. l.], v. 9, n. 17, p. 2105–2116, 1995.

WOLF, F. C. *et al.* Gene expression profiling during mouse embryonic stem cell differentiation and embryotoxicity testing. **Toxicology in Vitro**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 855–863, 2011.

WOZNEY, J. M. The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. **European Journal of Oral Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 1, p. 160–166, 1998. Suplemento 1.

XU, R. *et al.* Insights into epigenetic patterns in mammalian early embryos. **Protein & Cell**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 7–28, 2021.

YUE, L. *et al.* Egr3 as an important regulator of uterine decidualization through targeting Hand2. **Cell Biology International**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 406–416, 2023.

ZHANG, L. *et al.* RA induces differentiation of multipotent P19 cells towards male germ cell. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 85–91, 2015.

ZHANG, Q. *et al.* Digital PCR detection of mtDNA/gDNA ratio in embryo culture medium for prediction of embryo development potential. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, [s. l.], v. 14, p. 521–531, 2021.

ZHU, M.; ZERNICKA-GOETZ, M. Principles of self-organization of the mammalian embryo. **Cell**, [s. l.], v. 183, n. 6, p. 1467–1478, 2020.

ANEXO I

CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA

Título: Desenvolvimento de Método Alternativo para Avaliação de Herbicida em Embriões de Camundongo C57BL/6.

Title: Development of an Alternative Method for Herbicide Evaluation in C57BL/6 Mouse Embryos

Tipo: PESQUISA(research)

Responsável (PI): MURILO VIEIRA DA SILVA

CPF: 080.322.136-35

Data início (initial date): 01/09/2025

Data fim (end date): 30/09/2028

Nome da instituição/CNPJ: Universidade Federal de Uberlândia / 25.648.387/0001-18

Nome da CEUA: Comissão de Ética na Utilização de Animais

Cadastro solicitado à CEUA/Aprovado pela CEUA

Grupo Taxonômico	Animais	Linhagem	Idade	Peso Aproximado	Quantidade Solicitada à CEUA			Quantidade Aprovada pela CEUA		
					Machos	Fêmeas	Sexo não verificado	Machos	Fêmeas	Sexo não verificado
Roedor	Camundongo isogênico	C57BL/6	3-8 sem	20 gramas		168			168	
Roedor	Camundongo isogênico	C57BL/6	8 - 15 sem	25 gramas	35	null		35		
Roedor	Camundongo	C57BL/6	16-2	35 g		null				
Total Pesquisa		-	-	-	35	168	0	35	168	0
Total Animais		-	-	-	203			203		

Certificamos a atividade de ensino que envolve a criação, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), está de acordo com os ditames da Lei nº 11.794/2008, do Decreto nº 6.899/2009, bem como das normativas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA/MCTI.

We certify that the teaching proposal which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) is in accordance with Law # 11.794/2008, Decree # 6899/2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (Concea/MCTI).

Data de aprovação (approval date): 15/07/2025

Protocolo (protocol): CONCEA/MCTI/0301052024/PESQUISA/000001/2025