

AZIZE CRISTINA CAPELLI NASSR

**PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO DOS RECEPTORES
VEGFR-1 E VEGFR-2 EM TRÊS FASES DO
DESENVOLVIMENTO PULMONAR FETAL NO
MODELO DE HÉRNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÊNITA
INDUZIDA PELO NITROFEN**

CAMPINAS

Unicamp

2008

AZIZE CRISTINA CAPELLI NASSR

**PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO DOS RECEPTORES
VEGFR-1 E VEGFR-2 EM TRÊS FASES DO
DESENVOLVIMENTO PULMONAR FETAL NO
MODELO DE HÉRNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÊNITA
INDUZIDA PELO NITROFEN**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Doutor em Cirurgia, área de concentração em
Pesquisa Experimental

ORIENTADOR: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044**

N188p Nassr, Azize Cristina Capelli
Perfil imunohistoquímico dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 em
três fases do desenvolvimento pulmonar fetal no modelo de hérnia
diafragmática congênita induzida pelo nitrofen / Azize Cristina
Capelli Nassr. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Lourenço Sbragia Neto
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Feto - Anomalias . 2. Diafragma. 3. Anomalias congênicas.
4. Pulmão – Doenças – Diagnóstico. 5. Pulmão – Fisiologia. 6.
Angiogênese. 7. Rato como animal de laboratório – Gravidez. 8.
Modelo experimental. I. Sbragia Neto, Lourenço. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

**Título em inglês : Profile of receptors VEGFR-1 AND VEGFR-2 in three of fetal lung
development in congenital diaphragmatic hernia induced by nitrofen**

Keywords: • Fetus – abnormalities

- Congenital abnormalities
- Diaphragm
- Lung – disease – diagnostic
- Lung – Physiology
- Angiogenesis
- Rat, laboratory animal, pregnancy
- Experimental model

Titulação: Doutor em Cirurgia

Área de concentração: Pesquisa Experimental

Banca examinadora: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto
Prof. Dra. Wilma De Grava Kempinas
Prof. Dr. Antonio Aldo Melo Filho
Prof. Dr. Márcio Lopes Miranda
Prof. Dr. Antônio Gonçalves Oliveira Filho

Data da defesa: 18 - 12 - 2008

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Azize Cristina Capelli Nassr

Orientador: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Membros:

1. Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto -

2. Prof. Dr. Márcio Lopes Miranda -

3. Prof. Dr. Antônio Gonçalves Oliveira Filho -

4. Prof. Dr. Antônio Aldo Melo Filho -

5. Profa. Dra. Wilma de Grava Kempinas -

Curso de pós-graduação em Cirurgia, da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/12/2008

DEDICO ESTE TRABALHO

*Ao meu pai, **Georges**,
por todo amor, amparo,
por todo sacrifício, dedicação,
por fazer parte de minha vida
por todo exemplo de vida que
reflete o grande homem que é.*

*A minha mãe, **Zilda**,
por todo amor, ternura, apoio,
por todo cuidado, por todo sorriso.
por ser toda ouvidos
e por mostrar que através do
trabalho que conseguimos alcançar
nossos objetivos...*

*Ao meu irmão, **Nadim**,
por todo o bom humor, boa vontade,
por todo carinho, companheirismo
e por ser um menino tão perseverante
em sua vida...*

*A minha irmã, **Ana Olga**,
por toda paciência, respeito,
atenção, por todo carinho e
por ser uma mulher tão esforçada e especial.*

Onde não falta vontade existe sempre um caminho...

*A minha avó, **Olga Capelli**, por todo amor e carinho, por ter sido um exemplo de
dedicação a família, por ter me amado tanto... Saudades...*

*A **Deus**,*

ERGA-SE...

Sabe aquele momento que a gente pensa que chegou ao limite das próprias forças e que não vai mais conseguir avançar? Quando não contemos as lágrimas e tudo parece um grande vazio...

Esse momento que, não importa a nossa idade, pensamos que já é o fim... e um desânimo enorme toma conta da gente...

Esse momento, ao contrário do que parece, é justamente o ponto de partida!

Se chegarmos a um estado em que não avançamos mais, é que devemos provavelmente tomar uma outra direção.

Quando chegamos a esse ponto de tal insatisfação é sinal de que alguma coisa deve ser feita.

Não espere que os outros construam pra você, planeje e faça! Você é responsável pelos próprios sonhos e pela realização destes. Nas obras da vida não precisamos de arquitetos para planejar por nós. Com um pouco de imaginação e um muito de boa vontade podemos reconstruir sozinhos a casa que vamos morar e o futuro que nos oferecemos.

É humano se sentir fragilizado às vezes e mesmo necessário para que tenhamos consciência que não somos infalíveis, não somos super-heróis, mas seria desumano parar por aí. É injusto. Para os outros, mas principalmente para consigo mesmo. Recomeçar é a palavra! Recomeçar cada vez, a cada queda, a cada fim de uma estrada! Insistir!...

Se alguém te feriu, cure-se!

Se te derrubaram, levante-se!

Se te odeiam, ame!

Erga-se! Erga a cabeça!

Olhando pra baixo só podemos ver os próprios pés. É preciso olhar pra frente.

Plante uma árvore, faça um gesto gentil, tenha uma atitude positiva. É sempre possível fazer alguma coisa!

Não culpe os outros pelas próprias decepções, pelos próprios fracassos. Se somos nossos próprios donos para as nossas vitórias, por que não seríamos para as nossas derrotas?

Onde errou, não erre mais! Onde caiu, não caia mais! Se você já passou por determinado caminho, deve ter aprendido a evitar certas armadilhas.

Então, siga!

Não se esqueça de uma grande promessa feita na Bíblia:

"Esforça-te e eu te ajudarei."

Dê o primeiro passo... depois caminhe!!!

Tenho certeza que a felicidade não mora ao seu lado, nem à sua frente, ela está junto de você!

Descubra-se, faça-se feliz!

Autora: Leticia Thompson

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto, pelos ensinamentos, confiança, profissionalismo e orientação nos momentos difíceis, pela paciência nos momentos críticos. Muito Obrigada.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luis Violin, pelo constante profissionalismo e seriedade, muito obrigada pela contribuição.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro no auxílio pesquisa 08/50347-9

Aos professores do Departamento de Histologia e Embriologia, por permitir acesso aos laboratórios e equipamentos utilizados na execução deste trabalho e por me atenderem em minhas dificuldades.

Ao amigo Patrick Vianna, pela amizade, paciência, conselhos nesta caminhada e grande ajuda neste trabalho.

A amiga Frances Lilian, pela amizade, carinho que me ajudaram a enfrentar meus problemas profissionais, pessoais e grande ajuda neste trabalho.

Ao amigo Augusto Schmidt, pela amizade, solidariedade, conselhos, sinceridade que me foram oferecidos em momentos difíceis e grande ajuda neste trabalho.

A amiga Dra. Márcia Bueno, pela bondade, vivacidade, pelo respeito e carinho que existe em seu coração que ampara a todos em todos os momentos.

A amiga Jéssica Matheus, pela amizade, conselhos e divertidos momentos que passamos juntas.

A amiga Luciana Vivas, pela grande amizade e carinho em todos os momentos de minha vida.

Aos amigos Maidane, Fábio, Carolina e Aline pelos momentos agradáveis em que passamos em nossos trabalhos e pela ajuda em momentos variados na execução deste trabalho.

Ao Dr. Bruno Livani, pela agradável convivência e conselhos.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia, Juvani e Dona Raquel pelo apoio e contribuição na execução deste trabalho.

Aos amigos e funcionários do Prédio Vital Brasil da Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp, pela convivência, apoio, colaboração e pelos momentos de descontração.

Ao Programa de Pós Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp, por permitir acesso ao conhecimento.

Aos animais que foram utilizados neste trabalho e que se tornaram instrumento de conhecimento científico.

A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma.

John Ruskin

	PÁG.
RESUMO	<i>xxxiii</i>
ABSTRACT	<i>xxxvii</i>
1- INTRODUÇÃO	41
2- OBJETIVOS	47
2.1- Geral	49
2.2- Específico	49
3- MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1- Avaliação da Comissão de Ética na Experimentação Animal	53
3.2- Animais	53
3.3- Constituição dos Grupos Experimentais	54
3.4- Coleta das Amostras e Medidas Corporais	56
3.5- Processamento para Análise Histológica	58
3.6- Imunohistoquímica para receptores VEGFR-1 e VEGFR-2	58
3.7- Imagens e Análise Histológica, Morfométrica Estereológica	59
3.7.1- Cálculos Estereológicos.....	59
3.7.1.1- Volume do Pulmão TotalV (pu).....	59
3.7.1.2- Volume do Parenquima V (pa).....	59
3.8- Contagem de Células Imumarcadas de VEGFR-1 e 2	60
4- ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5- RESULTADOS	65
5.1- Análise Morfométrica	67

5.2- Análise Histométrica.....	80
5.3- Análise Imunoistoquímica.....	83
6- DISCUSSÃO.....	89
7- CONCLUSÃO.....	99
7.1- Geral.....	101
7.2- Específica.....	101
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
9- ANEXOS.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

DG	Dias Gestacionais
HDC	Hérnia Diafragmática Congênita
HP	Hipertensão Pulmonar
CE	Grupo Controle Externo
OO	Grupo Óleo e Oliva
VEGFR-1	Receptor of Vascular Endothelial Growth Factor -1 (Flt-1)
VEGFR-2	Receptor of Vascular Endothelial Growth Factor -2 (Flk-1)
PC	Peso corporal
PPT	Peso Pulmonar Total
PPE	Peso Pulmonar Esquerdo
PPD	Peso Pulmonar Direito
PP/PC	Relação Peso Pulmonar Total e Peso Corporal
VPT	Volume Pulmonar Total
VPE	Volume Pulmonar Esquerdo

LISTA DE NOTAÇÕES

min	Minuto
%	Porcentagem
°C	Grau Celcius
n°	Número
®	Marca registrada
µL	Microlitros
mL	Mililitros
µm	Micrômetros
cm	Centímetro
mm	Milimetro
mg	Miligrama
g	Gramma
n	Número de amostras
Kg	Quilogramas
G	(Gauge) Calibre de agulha
m	Massa
>	Maior
<	Menor

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Média dos pesos corporais (g) das ratas prenhes de acordo com os dias gestacionais (DG).....	67
Tabela 2- Médias dos pesos corporais (PC) (mg) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG.....	67
Tabela 3- Médias dos pesos pulmonares totais (PPT) (mg) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG...	70
Tabela 4- Médias dos pesos pulmonares esquerdo (PPE) (mg) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG...	72
Tabela 5- Médias da relação entre o peso pulmonar total e o peso corporal (PP/PC) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG.....	74
Tabela 6- Médias dos volumes pulmonares totais (μ L) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG.....	76
Tabela 7- Médias dos volumes pulmonares do lado esquerdo (mL) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG.....	78
Tabela 8- Médias da porcentagem das densidades de parênquima e dos volumes dos parênquimas pulmonares esquerdos (V_{pae}) (μ L) dos fetos dos com 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5 dias de idade gestacional dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG.....	80
Tabela 9- Médias dos pontos imunomarcados positivos pulmonares do lado esquerdo para os receptores VEGFR- 1 (flt-1) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG.....	83
Tabela 10- Médias dos pontos imunomarcados positivos pulmonares do lado esquerdo para os receptores VEGFR-2 (flk-1) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG.....	86

	PÁG.
Figura 1- Rata grávida, esfregaço vaginal e presença de espermatozóide na microscopia ótica configurando a gravidez da rata.....	53
Figura 2- Nitrofen e sua administração por gavagem na rata grávida.....	54
Figura 3- Esquema do estudo.....	55
Figura 4- Feto normal e dissecado, mensuração do peso e do volume pulmonares.....	57
Figura 5- Curvas evolutivas da média do peso corporal (mg) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os dias gestacionais (DG).....	68
Figura 6- Evolução corporal dos fetos de ratos CE e expostos ao nitrofen, e respectivas HDC de acordo com os DG.....	69
Figura 7- Curvas evolutivas da média do peso pulmonar total (mg) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG.....	71
Figura 8- Curvas evolutivas da média do peso pulmonar esquerdo (mg) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG.....	73
Figura 9- Curvas evolutivas da média da relação entre o peso pulmonar total e o peso corporal (PP/PC) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG.....	75
Figura 10- Curvas evolutivas da média do volume pulmonar total (μ L) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG.....	77
Figura 11- Curvas evolutivas da média do volume pulmonar esquerdo (μ L) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os dias DG.....	79

Figura 12-	Curvas evolutivas da média do volume da área do parênquima pulmonar esquerdo VPA (μL) dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG.....	81
Figura 13-	Parênquima pulmonar esquerdo com H&E (100 X) dos fetos de ratos CE, OO, expostos ao nitrofen, e respectivas HDC de acordo com os DG.....	82
Figura 14-	Curvas evolutivas das médias das porcentagens dos pontos imunomarcados positivos pulmonares do lado esquerdo para os receptores VEGFR- 1 dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG.....	84
Figura 15-	Imunoistoquímica para receptores VEGFR-1 em tecido pulmonar fetal esquerdo de acordo com o grupo e com os DG.....	85
Figura 16-	Curvas evolutivas da média da porcentagem dos pontos imunomarcados positivos pulmonares do lado esquerdo marcadas com VEGFR-2 dos fetos dos grupos CE, OO, Nitrofen sem e com HDC de acordo com os DG.....	87
Figura 17-	Imunoistoquímica para receptores de VEGFR-2 em tecido pulmonar fetal esquerdo de acordo com o grupo e com os DG.....	88

RESUMO



A Hérnia Diafragmática Congênita (HDC) é um defeito da formação do músculo diafragma que incide em aproximadamente 1:2500 nascidos vivos e apresenta altos índices de mortalidade fetal e neonatal decorrentes da hipoplasia e da hipertensão pulmonares. Este defeito pode ser induzido experimentalmente em ratas grávidas administrando o herbicida nitrofen que causa HDC em 24% dos fetos. A análise microscópica do pulmão da HDC demonstra a presença de hipoplasia pulmonar além de alveolização e vascularização alterada. Um dos fatores de crescimento envolvidos no desenvolvimento vascular é o VEGF (vascular endothelial growth factor) e seus receptores, no entanto ainda não se conhece como a expressão desta glicoproteína e de seus receptores varia ao longo do desenvolvimento pulmonar fetal nesta doença.

Utilizando o modelo experimental de HDC induzido pelo nitrofen (2,4-dicloro-4-nitrodifenil éter) investigamos o grau de hipoplasia pulmonar e por meio de análise imunoistoquímica, comparamos a expressão dos receptores para o VEGF em três fases do desenvolvimento pulmonar, pseudoglandular, canalicular e sacular de fetos de ratos normais e com HDC.

Dividimos o experimento em ratas da raça Sprague–Dawley em três grupos: controle externo (CE), exposto ao óleo de oliva (OO) e expostas ao nitrofen com e sem HDC. Estudamos quatro grupos de 20 fetos cada em cinco dias gestacionais (DG) diferentes 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5. As variáveis morfológicas estudadas foram: peso corporal (PC), peso pulmonar total (PPT), peso do pulmão esquerdo (PPE), relação PPT/PC, volume pulmonar total (VPT) e volume do pulmão esquerdo (VPE). As variáveis histométricas estudadas foram: parênquima pulmonar (Par), espaço aéreo (EA), densidade do parênquima (DAP) e volume do parênquima do pulmão esquerdo. A avaliação imunohistoquímica foi realizada por meio da contagem de pontos de receptor de VEGFR-1 e 2.

Obtivemos 37 % (100/270) de HDC nas ratas expostas ao nitrofen, todas variáveis morfológicas e histométricas indicam diminuição dos resultados no grupo nitrofen com e sem HDC em relação aos demais, mas que se acentuam mais ainda no grupo HDC. Essas alterações são mais evidentes a partir dos DG 18,5 e 19,5. A imunomarcagem para os receptores VEGFR-1 aumentou nos grupos nitrofen e foram progressivamente maiores no grupo nitrofen com HDC ($p < 0,005$) que os fetos dos grupo CE e OO a partir do dia

gestacional 17,5, fase pseudoglandular com pico máximo no dia gestacional 19,5. O mesmo ocorreu com os receptores de VEGFR-2 a partir do dia gestacional 17,5, fase pseudoglandular até o dia 21,5 fase sacular do desenvolvimento pulmonar.

Concluimos que o modelo é válido e que os fetos expostos ao nitrofen com e sem HDC apresentam hipoplasia pulmonar primária sendo mais acentuada nos fetos portadores de HDC. O mesmo resultado ocorre com imunomarcção para os receptores de VEGFR-1 e 2 que foram maiores na HDC.

ABSTRACT



The Congenital Diaphragmatic Hernia (CDH) is a defect in the embryogenesis of the diaphragm with an incidence of 1:2500 liveborns and high fetal and neonatal mortality due to pulmonary hypoplasia and hypertension. This defect can be experimentally induced in fetuses of pregnant rats by the administration of Nitrofen, an herbicide that causes CDH in 24% of the fetuses. The histology of lungs in CDH shows pulmonary hipoplasia and not only the alveolarization but also the vascularization are affected. These changes lead to a high neonatal mortality because of the thickening of the middle layer of the arterioles causing pulmonary hypertension. One of the factors involved in the growth of the arterioles is VEGF (vascular endothelial growth factor) and its receptors; however, it is not known how the expression of this glycoprotein and its receptors change during lung development in this disease.

In Brazil, the experimental model has never been tested. So, we tested the model and verified the degree of pulmonary hipoplasia and, using imunohistochemistry, we compared the expression of the receptor of VEGF in three different stages of lung development, pseudoglandular, canalicular and saccular, of normal rat fetuses and fetuses with CDH.

Female Sprague-Dawley rats were divided in three groups: external control (EC), exposed to olive oil (OO) and exposed to nitrofen (N). We studied four groups – EC, OO, N with CDH and N without CDH - with 20 fetuses in each five different gestational days (GD) 17,5, 18,5, 19,5, 20,5, 21,5. The morphologic variables studied were: body weight (BW), total lung weight (TLW), left lung weight (LLW), relationship TLW/BW, total lung volume (TLV) and left lung volume (LLV). The hystometric variables studied were: lung parenchyma (LP), air space (AS), left lung parenchyma density (PD) and left lung parenchyma volume (PV). The immunohistochemistry variables were: points positive and negative for the receptor for VEGF 1 and 2.

We had 37% (100/270) of CDH frequency in the fetuses exposed to nitrofen. All the morphological and hystometrical variables show a reduction in the nitrofen group with and without CDH, which were more pronounced in the group of fetuses with CDH. These changes are more evident from the GD 18,5 and 19,5 on. The receptors VEGFR-1 e 2 are increased in the nitrofen groups with and without CDH, but this increase is higher in the fetuses with CDH.

We conclude that the model is valid and that the fetuses exposed to nitrofen with and without CDH show primary pulmonary hypoplasia that is more pronounced in CDH, the same is also observed in the receptors of VEGFR-1 and 2.

1- INTRODUÇÃO

O diafragma é um músculo situado na caixa torácica que reveste a abertura inferior do tórax e compartimentaliza o tronco nas regiões torácica e abdominal (Moore et al., 2007). A Hérnia Diafragmática Congênita (HDC), descrita por Bochladek em 1848, é um defeito do desenvolvimento que decorre do não fechamento do músculo diafragma e possibilita a protrusão das vísceras abdominais para a caixa torácica (Moore e Persuad, 2004); ocorre em 95% dos casos na região pósterolateral e do lado esquerdo (Torfs et al., 1992).

A HDC incide em aproximadamente 1:2500 nascidos vivos (Lally, 2002). A mortalidade geral varia com os estágios do desenvolvimento e, apesar de todos os avanços diagnósticos, é de aproximadamente 50% (Harrison, 1994). Esse número, entretanto, esconde uma porção de pacientes afetados que não são registrados (*hidden mortality*), pois ficam ocultos os casos não diagnosticados, não encaminhados a centros de referência ou o óbito cujo defeito não foi a principal causa (Harrison, 1978). No Brasil, a mortalidade em casos isolados de HDC diagnosticados pré-natal é próxima de 90% e apesar da elevada mortalidade e complicações, a causa embrionária e a fisiopatologia da HDC são pouco conhecidas (Ruano, 2006).

As principais complicações da HDC são decorrentes da hipoplasia e da hipertensão pulmonares (Harrison, 1994). Essas complicações ocorrem porque as vísceras abdominais que herniaram para a cavidade torácica ocupam parte do espaço normalmente reservado para acomodar os pulmões em crescimento, de forma que o pulmão fetal destes pacientes apresenta deficiências no crescimento, desenvolvimento vascular e produção de surfactante (Areechon e Reid, 1963; Kitigawa et al.; 1971; Geggel et al.; 1985, Nakamura et al., 1991).

A hipoplasia pulmonar é caracterizada por um pulmão de tamanho menor que o normal associado ao comprometimento da maturação das vias respiratórias e septos alveolares, bem como redução de número das ramificações brônquicas, dos ácinos e dos alvéolos (Wu et al., 2002; Yamataka et al., 1997). Adicionalmente, nos pulmões com HDC, ocorre espessamento da musculatura da camada média das artérias de médio e pequeno calibre, com muscularização deficiente das artérias intra-acinares e, uma redução da área de secção transversal da vasculatura pulmonar Kitigawa et al.; 1971; Geggel et al.; 1985,

Nakamura et al., 1991; Yamataka et al., 1997; Wu et al., 2000). Essa hipertrofia do leito vascular causa uma elevação da resistência vascular dos pulmões, o que explica, em parte, o quadro conhecido como hipertensão pulmonar. A Hipertensão Pulmonar Persistente do recém-nascido (HPP) é decorrente de uma falha no processo de redução pós-natal imediata da resistência pulmonar, necessária para que o pulmão possa assumir rapidamente o papel de trocas gasosas (Gosche et al., 2005).

Na fisiopatologia da hipertensão pulmonar da HDC, diversos fatores de crescimento estão diminuídos, como o bFGF (*Fibroblast Growth Factor*), PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) e o TGF β -1 (*Transforming Growth Factor*) (Kitano et al., 2001), já a outros fatores ligados a reatividade vascular como a ECA (Enzima Conversora da Angiotensina) e endotelina-1 estão aumentadas (Scheffers et al., 1994). Assim, a resistência vascular não é apropriadamente reduzida ao nascimento (ocorre uma resposta vaso-constritora exarcebada), colaborando para a Hipertensão Pulmonar Persistente (HPP) do recém-nascido, que é a maior causa de mortalidade e morbidade na HDC (Gosche et al., 2005). Portanto, estudar os mecanismos moleculares do desenvolvimento vascular na região do pulmão pode contribuir para o melhor entendimento e possível tratamento da doença.

A vasculogênese e a angiogênese no pulmão em desenvolvimentos são dependentes de diversos mecanismos nos quais participam uma rede complexa de moléculas sinalizadoras, dentre as quais se destaca o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Voelkel et al., 2006).

O VEGF é um mitógeno e fator de crescimento específico de células endoteliais que atua na regulação da proliferação, diferenciação e crescimento vascular. É considerado uma molécula chave na formação de novos vasos sanguíneos e, crescimento e organização do leito vascular (Ferrara e Davis, 1997; Toi et al., 2001) cuja expressão de mRNA do VEGF, em fetos humanos (16-22 semanas) é mais abundante no pulmão, rim e pâncreas (Toi et al., 2001).

No pulmão, essa molécula inicia uma cascata sinalizadora intracelular por meio de receptores tirosino-kinase localizados na superfície dessas células: o VEGFR-1 (ou Flt-1 - fms-like tyrosine kinase-1) e o VEGFR-2 (ou Flk-1 - fetal liver kinase-1)

(Yamamoto et al., 2007). Esses receptores apresentam elevada afinidade ao VEGF e seus efeitos na sinalização do VEGF são bastante distintos (Neufeld et al., 1999; Matsumoto et al., 2001).

A sinalização por meio do VEGFR-2 produz diversas respostas celulares, incluindo intensos sinais mitogênicos e de sobrevivência para células endoteliais e seus precursores (Waltenberger et al., 1994; Bernatchez et al., 1999), de maneira que o silenciamento dos genes para o VEGFR-2 produz redução ou abolição da vasculogênese em ratos (Shalaby et al., 1995; Shalaby et al., 1997). Já o VEGFR-1 atua no desenvolvimento de vasos sanguíneos modulando negativamente a divisão das células endoteliais, pois coíbe a sinalização pelo VEGFR-2 (Kearney et al., 2002; Roberts et al., 2004). Ratos com silenciamento dos genes para o VEGFR-1 não sobrevivem até o fim da gestação e apresentam hipertrofia e desorganização do leito vascular (Fong et al., 1995). Além disso, os diversos efeitos do VEGF nas células epiteliais e vasculares sugerem que a expressão espaço-temporal do VEGF é importante, não apenas para a formação da rede capilar, mas também para o acompanhamento do crescimento brônquico e alveolização (Jakkula et al., 2000; Hislop, 2002; Yamamoto et al., 2007).

Modelos animais para o estudo da HDC têm servido para melhorar a compreensão da fisiopatologia da doença e para desenvolver mecanismos de tratamento fetal. Dentre eles, se destacam os modelos por indução cirúrgica e o modelo toxicológico.

O modelo cirúrgico simula o defeito anatômico observado na HDC. Este modelo é particularmente adequado para a realização de manipulações cirúrgicas pré e pós-natal devido ao grande porte dos animais utilizados, especialmente ovelhas e coelhos. A principal desvantagem desse modelo é o seu alto custo (Kling e Schnitzer, 2007).

Não encontramos na literatura nacional informações da utilização do modelo toxicológico com nitrofen para o estudo de HDC, mas para o estudo cirúrgico, Fauza et al. (1994) da Universidade de São Paulo publicaram o modelo de HDC em coelho.

O modelo de teratogênese utilizando o herbicida nitrofen (2,4-dicloro-4'-nitrodifenil éter) é o mais aceito para a simulação experimental da HDC em pequenos animais. A administração de nitrofen a fêmeas prenhes no nono dia de gestação

produz aproximadamente 24% da prole de ratos e camundongos com esta malformação. As principais vantagens desse modelo são o baixo custo, fácil manuseio e maior quantidade de fetos acometidos (Kluth et al., 1990; Allan e Greer, 1997; Kling e Schnitzer, 2007).

Neste modelo a expressão pulmonar do VEGF está alterada na HDC (Oue et al., 2002; Shehata et al., 1999). Entretanto, não é conhecido o que acontece com a expressão dos receptores do VEGF durante as fases finais do desenvolvimento pulmonar na doença. Deste modo, estudar a expressão destes receptores pode fornecer subsídios para uma melhor compreensão da hipertensão pulmonar e da fisiopatologia da doença.

2- OBJETIVOS

2.1- Geral

Testar o método de criação de HDC por meio toxicológico utilizando o herbicida nitrofen e verificar se a hipoplasia pulmonar é primária, devido à ação da droga diretamente sobre o desenvolvimento do pulmão, ou secundária à compressão pulmonar pelos órgãos abdominais.

2.2- Específico

2.2.1- Avaliar por métodos morfométricos e estereológicos os pulmões de fetos normais de ratas Sprague–Dawley e os pulmões de fetos expostos ao nitrofen com e sem HDC em três fases do desenvolvimento pulmonar fetal.

2.2.2- Determinar e comparar por meio de imunohistoquímica, a expressão dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 nos pulmões de fetos normais de ratas Sprague–Dawley e nos pulmões de fetos expostos ao nitrofen com e sem HDC nas mesmas fases do desenvolvimento pulmonar fetal.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Avaliação do Comitê de Ética

O presente experimento foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA-UNICAMP) e foi aprovado como projeto de pesquisa, sob protocolo número 935-1 (anexo final).

3.2- Animais

Ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas adultas provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB - UNICAMP, Campinas), foram mantidos em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz / 12 horas de escuro), temperatura (média de 23°C), umidade relativa próxima de 55% e receberam água e ração para roedores à vontade. Os acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo, colocando-se duas fêmeas na caixa do macho, e o dia zero de prenhes foi determinado pela presença de espermatozoides em esfregaços vaginais de fêmeas em estro (gestação de 22 dias) (Figura 1).

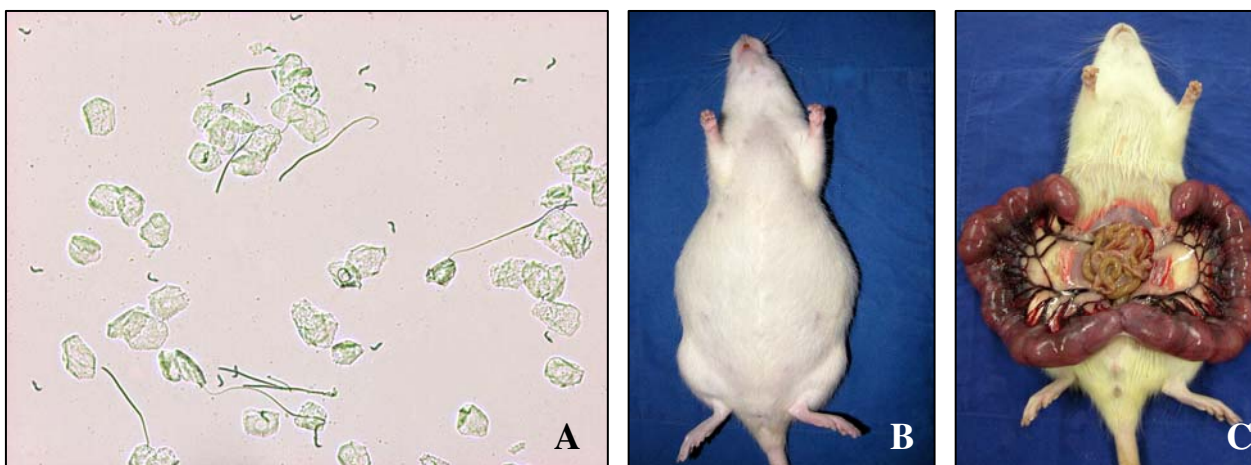


Figura 1- Fotomicroscopia de luz em A de esfregaço vaginal positivo, com a presença de espermatozói­de. Foto da rata prenhe em B e exposição dos cornos uterinos no dia gestacional (DG) 22 em C.

3.3- Constituição dos Grupos Experimentais

As ratas prenhes foram divididas em 3 grupos experimentais:

Grupo I (GI): ratas prenhes não submetidas a nenhum procedimento denominadas grupo controle externo (CE).

Grupo II (GII): ratas prenhes que receberam óleo de oliva no DG 9,5, via oral (gavagem) denominadas grupo óleo de oliva (OO).

Grupo III (GIII): ratas prenhes que receberam Nitrofen (Chem Service; West Chester, PA) dose única de 100 mg diluído em 1 ml de óleo de oliva no DG 9,5, via oral (gavagem) de acordo com Kluth et al. (1990) (Figura 2). Este grupo foi constituído de 2 subgrupos, um no qual os fetos desenvolveram hérnia diafragmática congênita (HDC) e o outro no qual os fetos que não desenvolveram hérnia. Todas as ratas dos diferentes grupos foram submetidas à laparotomia (cesáreas), e tiveram seus fetos retirados e mensurados nos dias gestacionais (DG) 17,5; 18,5; 19,5; 20,5 e 21,5 (Figura 3. Esquema do estudo).



Figura 2- Administração de Nitrofen (100mg/ml), por gavagem, em rata prenhe no DG 9,5.

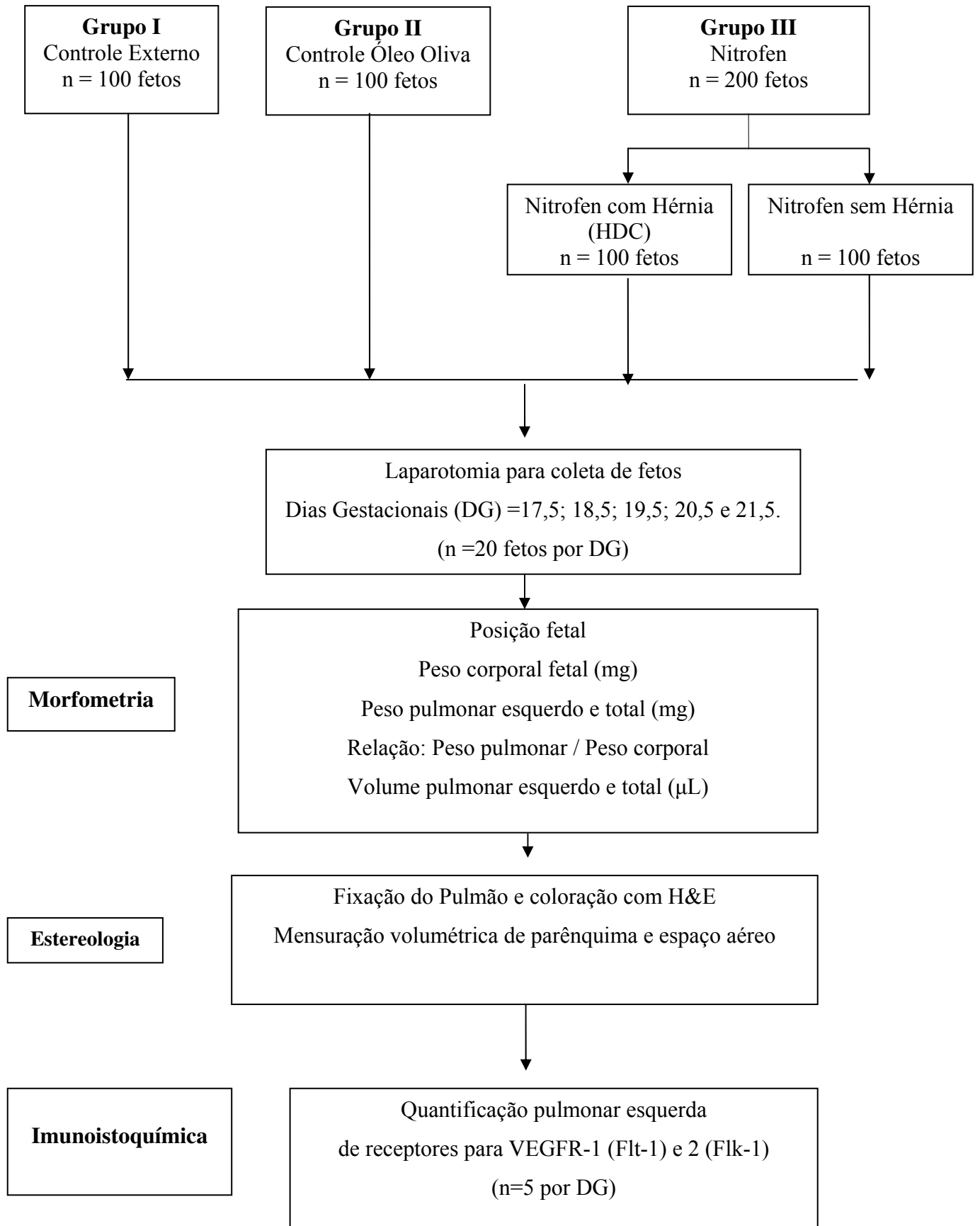


Figura 3- Esquema de estudo

3.4- Coleta das Amostras e Medidas Corporais

Nos dias gestacionais (DG) 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5, as ratas foram anestesiadas com injeção intramuscular de Ketamina base – 50mg/ml associada com xilazina - 20mg/ml na dose de 0,56ml via intramuscular aplicada na musculatura lateral da coxa com seringa de insulina e agulha 20G e submetidas à laparotomia (cesárea). Após a secção da musculatura uterina e membranas coriônicas e amnióticas subjacentes os fetos foram extraídos do útero e pesados - peso corporal (mg) - em balança analítica. Após pesagem, os fetos foram imediatamente sacrificados através de punção occipital com agulha 20G e dose de nembutal (tiopental sódico) intraperitoneal de 200mg/Kg peso corporal. Em seguida, os fetos foram colocados em pequena mesa de cortiça e fixados com alfinetes para dissecação. Os fetos do grupo CE e OO tiveram o abdome e tórax abertos e os pulmões foram removidos, pesados e em seguida fixados em solução de formaldeído a 10%. Os fetos do grupo nitrofen foram examinados com auxílio de uma lupa de magnitude 2,5X. O abdome foi aberto e o diafragma foi cuidadosamente examinado quanto à ausência ou presença de hérnia diafragmática que foi caracterizada por um orifício amplo na parede posterior do tórax com a presença do fígado ou estômago dentro do tórax. Após confirmação da hérnia, os pulmões foram removidos do mesmo modo que no grupo CE e OO. O peso pulmonar total e o peso pulmonar esquerdo (lado mais comumente acometido pela hérnia diafragmática) foram mensurados. Os valores de peso corporal fetal (mg), peso pulmonar (mg) obtido “a fresco” para os cálculos da relação peso pulmonar / peso corporal (PP/PC), foram aferidos (Figura 4).



Figura 4- Fotografias de fetos dissecados sem HDC em A e com HDC em B, mensuração do peso pulmonar em C e mensuração do volume pulmonar em D.

3.5- Processamento para Análise Histológica

O pulmão esquerdo fixado foi lavado em tampão fosfato e processado seguindo protocolo para inclusão em parafina. As amostras histológicas foram seccionadas (5 µm espessura) e os cortes foram desparafinizados e corados com hematoxilina-eosina e examinados em microscopia de luz.

3.6- Imunoistoquímica para Receptores de VEGFR-1 (flt-1) E VEGFR-2 (flk-1)

Cortes histológicos de pulmão esquerdo em diferentes idades gestacionais: 17,5; 18,5; 19,5; 20,5 e 21,5 foram submetidos à reação imunoistoquímica para a identificação dos receptores VEGFR-1(flt-1) e VEGFR-2 (flk-1). Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, e re-hidratados em série decrescente de etanol. Em seguida, para a exposição de epítomos, os cortes foram incubados com borato de sódio 0,1M em PBS (tampão fosfato) por 1 hora. Em todas as diluições o tampão PBS foi utilizado a 0,01M pH 7,4. Posteriormente, os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio a 10% em PBS por 30 minutos, seguido pela incubação com BSA (Bovine Serum Albumin) a 1% em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir, os cortes histológicos foram incubados “overnight” a 4°C com o anticorpo primário VEGFR-1 (sc-316: Flt-1, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia) ou VEGFR-2 (sc-6251: Flk-1; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia) diluídos 1:100 e 1:50, respectivamente, em PBS/BSA 1%. Com o término desta etapa, os cortes histológicos foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário anti-coelho feito em cabra, biotilado (Dako A/S, Glostrup, Denmark) ou anti-camundongo feito em cabra, biotilado (Sigma-Aldrich), dependendo se foram incubados com VEGFR-1 ou VEGFR-2, respectivamente, ambos diluídos 1:200 em PBS/BSA 1%. Transcorrido o período de incubação, os cortes foram lavados em TBS 0,05 M pH 7,4 e tratados com estreptoavidina-biotina peroxidase (Dako A/S), diluída 1:400 em TBS 0,05M pH 7,4 por 45 minutos. A revelação ocorreu com a utilização de solução de peróxido de hidrogênio e diaminobenzidina (DAB) (Sigma Aldrich); as secções foram contra coradas com hematoxilina de Harris.

3.7- Obtenção de Imagens e Análise Histológica, Morfométrica e Estereológica

Obtivemos 50 imagens, aumento de 200X, de cortes histológicos do pulmão esquerdo de 5 animais de cada idade gestacional pertencente aos diferentes grupos, totalizando 250 imagens para cada grupo. Para as análises estereológicas foi utilizado um retículo com 100 pontos gerado pelo software Image-Pro Plus versão 4.1.0.0 (Média Cybernetics) para Windows 95/NT/98 da empresa.

3.7.1- Cálculos Estereológicos

3.7.1.1- Volume Do Pulmão V (pu)

O cálculo do volume pulmonar total foi obtido utilizando o princípio de Arquimedes no qual o volume do órgão é determinado segundo o deslocamento do nível da água que este, suspenso por um fio, provoca ao ser colocado num recipiente contendo água, sem tocar as paredes e o fundo do mesmo (Scherle, 1970; Howard e Reed, 1998).

3.7.1.2- Volume do Parênquima V (pa)

A densidade da área de parênquima (DAP) foi estimada dividindo o número de pontos que caem no parênquima (Pp), excluindo grandes brônquios e grandes vasos sanguíneos, pelo número de pontos que caem no pulmão como um todo (Pu), excluindo o espaço aéreo, com aumento de 200X.

$$DAP = \frac{Pp}{Pu}$$

O volume de parênquima do pulmão esquerdo V (pa) foi obtido multiplicando V (pu) pela (DAP), segundo Papadakis et al., 1998.

$$V (Pa) = V (pu) \times DAP$$

3.8- Contagem de Células Imunomarcadas para os Receptores de VEGFR-1 ou VEGFR-2

A contagem de pontos celulares imunomarcados para VEGFR-1 ou VEGFR-2 foram expressa em porcentagem, sendo determinada pelo número de pontos que incidem na marcação positiva (Pmp) dividido pelo número total de pontos (Pt) e multiplicado por 100%.

$$Células\ Imunomarcadas = \frac{Pmp}{PT} \times 100\%$$

4- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos através de morfometria e estereologia foram comparados entre os grupos: Controle Externo (CE), Óleo de Oliva (OO), nitrofen sem HDC e com HDC pelo método de ANOVA com pós-teste Tukey-Kramer, considerando as diferenças significativas para $p \leq 0,05$. A porcentagem de pontos imunomarcados positivamente pelos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 foram analisados pelo método de Qui-Quadrado e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP), considerando as diferenças significativas para $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,001$.

5- RESULTADOS

Tabela 1- Evolução do peso materno em g, de acordo com os dias gestacionais (DG), expressa pela média \pm desvio padrão.

DG	Controle Externo n=22	Óleo de Oliva n=16	Nitrofen n=25
17,5	355 \pm 47	371 \pm 50	365 \pm 15
18,5	370 \pm 18	353 \pm 25	351 \pm 18
19,5	398 \pm 32	377 \pm 30	405 \pm 25
20,5	380 \pm 44	350 \pm 25	388 \pm 45
21,5	396 \pm 13	364 \pm 6	371 \pm 42

Não houve diferença estatística, $p > 0,05$, para o ganho de peso de ratas prenhes expostas ao nitrofen e ratas prenhes do grupo CE e OO. Entretanto, o grupo nitrofen era constituído de 31 ratas prenhes expostas, destas apenas 25 permaneceram prenhes e ganharam peso.

A média de fetos por gestação, em todos os grupos, foi igual a 12 e a quantidade de fetos com HDC do lado esquerdo, no grupo nitrofen, foi de 37 % (100/270).

5.1- Análise Morfométrica

Tabela 2- Peso corporal dos fetos (PC), em mg, dos grupos CE, OO, nitrofen sem HDC e com HDC, nos respectivos dias gestacionais (DG), cujos valores foram expressos por médias \pm desvio padrão.

DG	Grupo Controle Externo	Grupo Óleo de Oliva	Grupo Nitrofen	
			Sem HDC	HDC
17,5	1578 \pm 68	1347 \pm 65 ^{**a}	1249 \pm 304 ^{**a*d}	1396 \pm 103 ^{*a}
18,5	2368 \pm 185	2438 \pm 134	2113 \pm 167 ^{ab**}	2129 \pm 200 ^{**ab}
19,5	3909 \pm 400	3642 \pm 323 ^{*a}	3419 \pm 204 ^{**a}	3098 \pm 252 ^{**abc}
20,5	5554 \pm 405	5033 \pm 434 ^{**a}	4573 \pm 389 ^{**a*b}	4505 \pm 360 ^{**ab}
21,5	6465 \pm 477	5797 \pm 292 ^{**a}	5612 \pm 553	5414 \pm 512

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; ^a Referente ao grupo CE, ^b Referente ao grupo OO; ^c Referente ao grupo nitrofen sem HDC, ^d Referente ao grupo nitrofen com HDC

Os valores de média \pm desvio padrão, acima citados, constam nos anexos 1 a 5 CE; anexos 6 a 10 OO; anexos 11 a 15 nitrofen sem HDC e anexos 16 a 20 nitrofen com HDC.

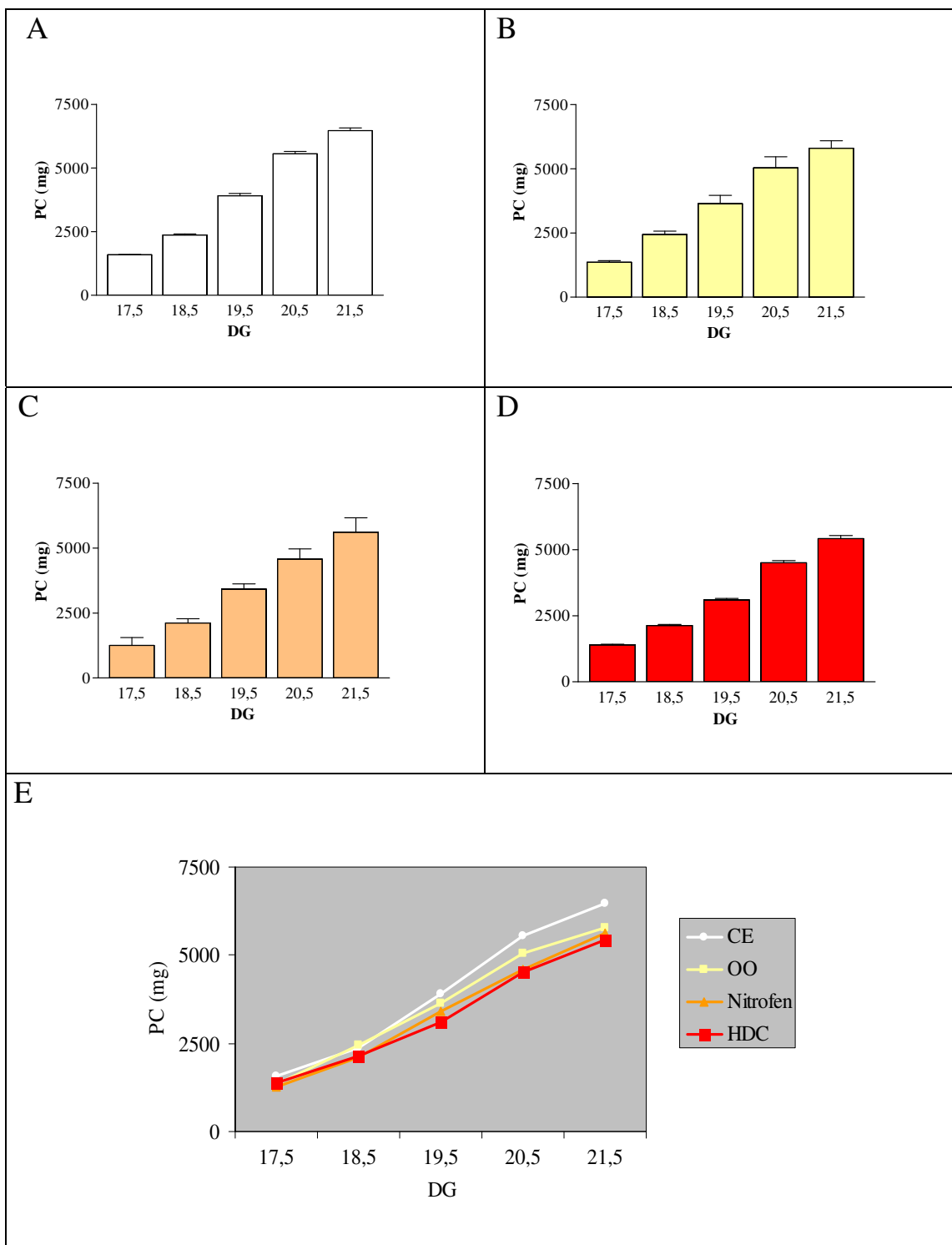


Figura 5- Histogramas de médias \pm desvio padrão dos pesos corporais dos fetos (PC), em mg, dos grupos CE (A), OO (B), nitrofen sem HDC (C) e com e HDC (D), nos respectivos dias gestacionais (DG). Curva evolutiva geral (E) da média dos pesos corporais dos fetos.

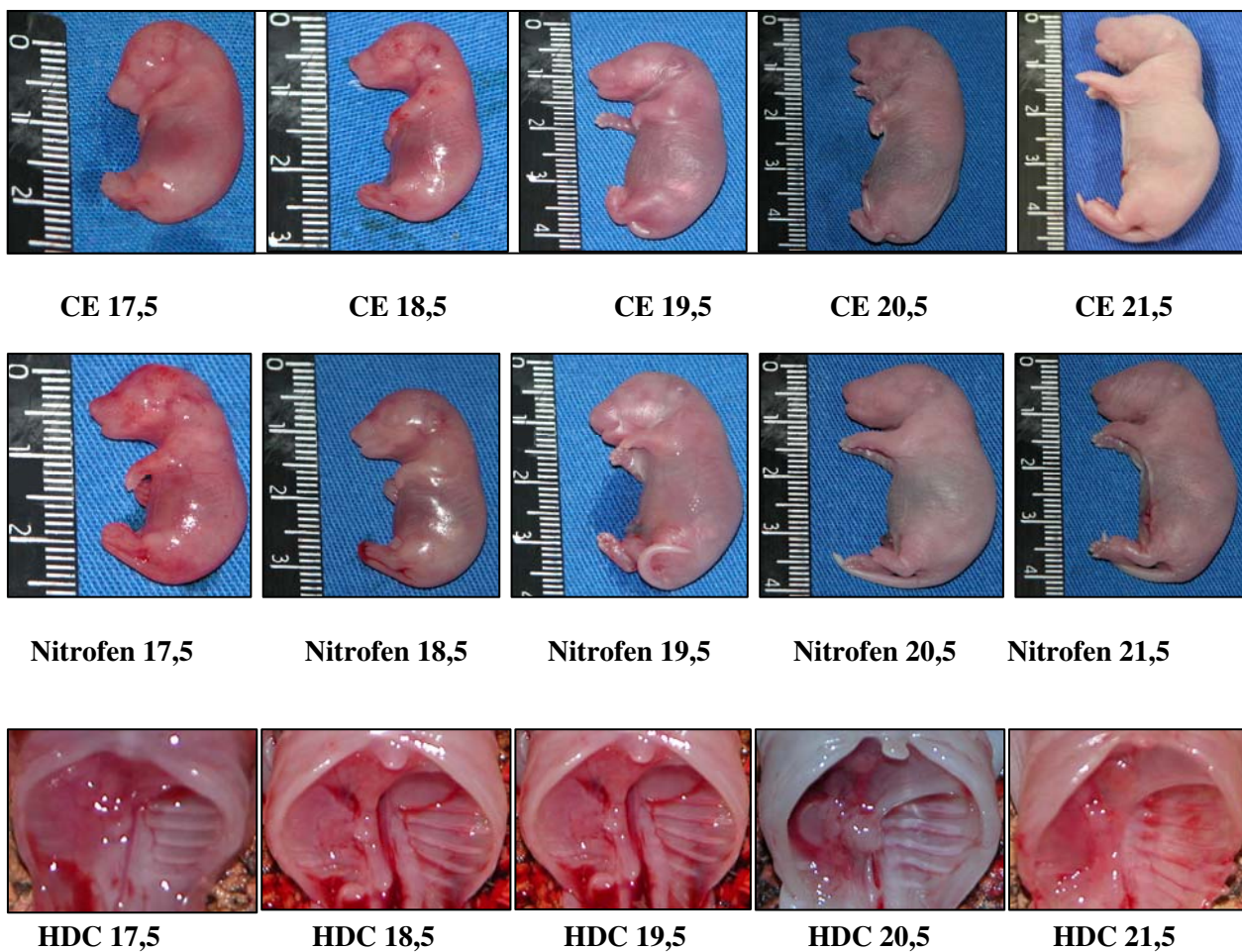


Figura 6- Fotos ilustrativas da evolução corporal fetal de ratos dos grupos CE e expostos ao nitrofen, e dissecção de fetos com HDC nos respectivos dias gestacionais (DG).

Tabela 3- Peso pulmonar total ds fetos (PPT), em mg, dos grupos CE, OO, nitrofen sem HDC e com HDC, nos respectivos dias gestacionais (DG), cujos valores foram expressos por médias \pm desvio padrão.

DG	Grupo Controle Externo	Grupo Óleo de Oliva	Grupo Nitrofen	
			Sem HDC	HDC
17,5	51 \pm 7,2	44 \pm 7,3 ^{*a}	31 \pm 4,2	29 \pm 5,9
18,5	80 \pm 17	89 \pm 9,2	63 \pm 10,8 ^{**ab}	59 \pm 8,3 ^{**ab}
19,5	126 \pm 10,9	130 \pm 17,2	105 \pm 15 ^{**ab}	77 \pm 14 ^{**abc}
20,5	147 \pm 33	140 \pm 14,9	104 \pm 15,8 ^{**ab}	80 \pm 11,5 ^{**ab*c}
21,5	145 \pm 16,9	144 \pm 12,4	101 \pm 19 ^{**ab}	78 \pm 13 ^{**abc}

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; ^a Referente ao grupo CE, ^b Referente ao grupo OO; ^c Referente ao grupo nitrofen sem HDC, ^d Referente ao grupo nitrofen com HDC.

Os valores de média \pm desvio padrão, acima citados, constam nos anexos 1 a 5 CE; anexos 6 a 10 OO; anexos 11 a 15 nitrofen sem HDC e anexos 16 a 20 nitrofen com HDC.

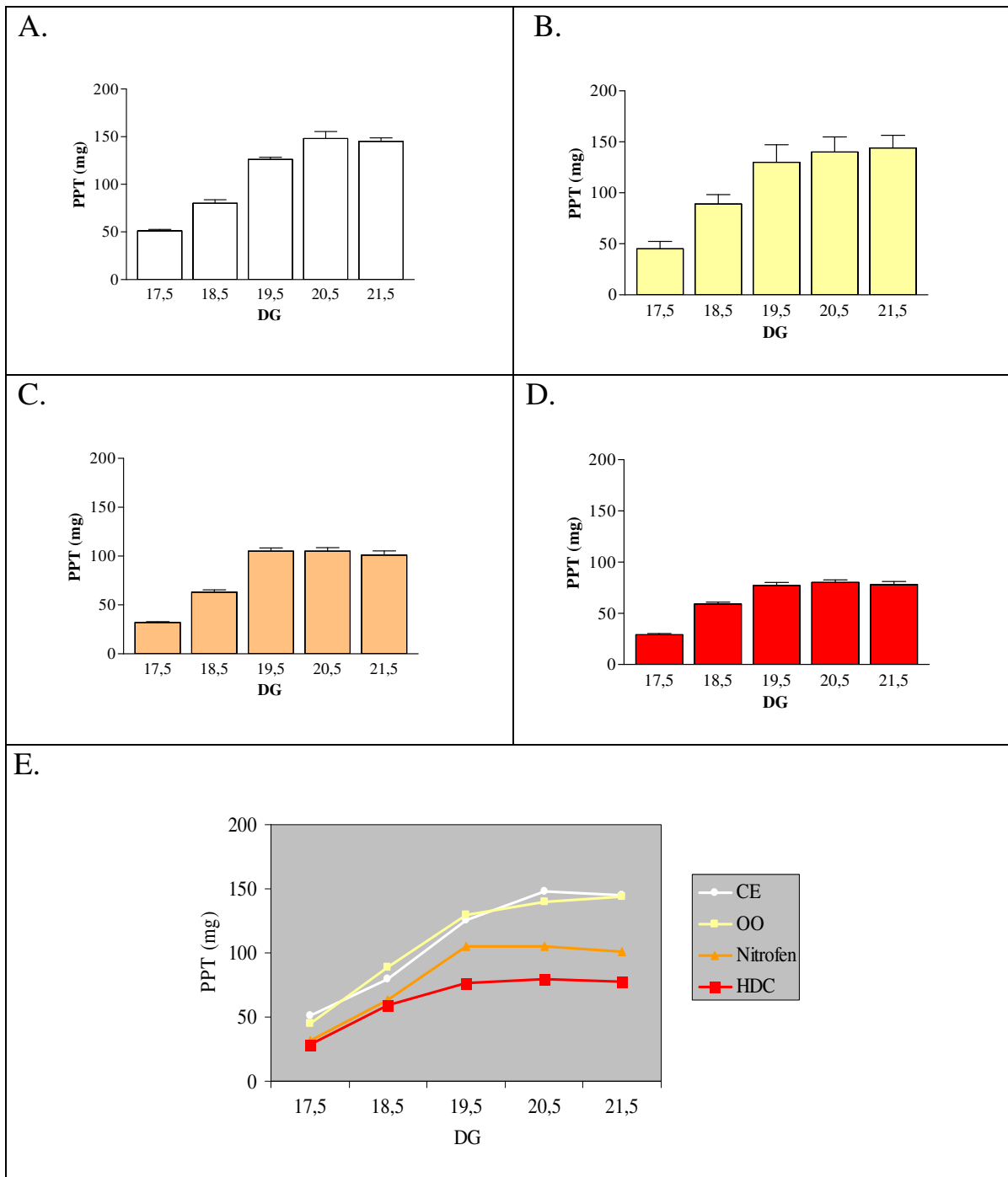


Figura 7- Histogramas de médias \pm desvio padrão dos pesos pulmonares totais (PPT), em mg, dos grupos CE (A), OO (B), nitrofen sem HDC (C) e com HDC (D), nos respectivos dias gestacionais (DG). Curva evolutiva geral (E) da média dos pesos pulmonares totais dos fetos.

Tabela 4- Peso pulmonar esquerdo dos fetos (PPE), em mg, dos grupos CE, OO, nitrofen sem HDC e com HDC, nos respectivos dias gestacionais (DG), cujos valores foram expressos por médias \pm desvio padrão.

DG	Grupo Controle Externo	Grupo Óleo de Oliva	Grupo Nitrofen	
			Sem HDC	HDC
17,5	17 \pm 2,5	14 \pm 1,6 ^{**a}	10 \pm 1,4 ^{**ab}	9 \pm 2,6 ^{**ab}
18,5	29 \pm 6,1	29 \pm 2,8	23 \pm 4,1 ^{**ab}	20 \pm 3,3 ^{**ab}
19,5	43 \pm 5,8	44 \pm 5,7	38 \pm 5,1 ^{a**b}	25 \pm 6,4 ^{**abc}
20,5	51 \pm 11,2	48 \pm 6,3	38 \pm 6,7 ^{**ab}	25 \pm 5,0 ^{**abc}
21,5	50 \pm 6,5	49 \pm 5,0	38 \pm 6,1 ^{**ab}	25 \pm 5,6 ^{**abc}

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; ^a Referente ao grupo CE, ^b Referente ao grupo OO; ^c Referente ao grupo nitrofen sem HDC, ^d Referente ao grupo nitrofen com HDC.

Os valores de média \pm desvio padrão, acima citados, constam nos anexos 1 a 5 CE; anexos 6 a 10 OO; anexos 11 a 15 nitrofen sem HDC e anexos 16 a 20 nitrofen com HDC.

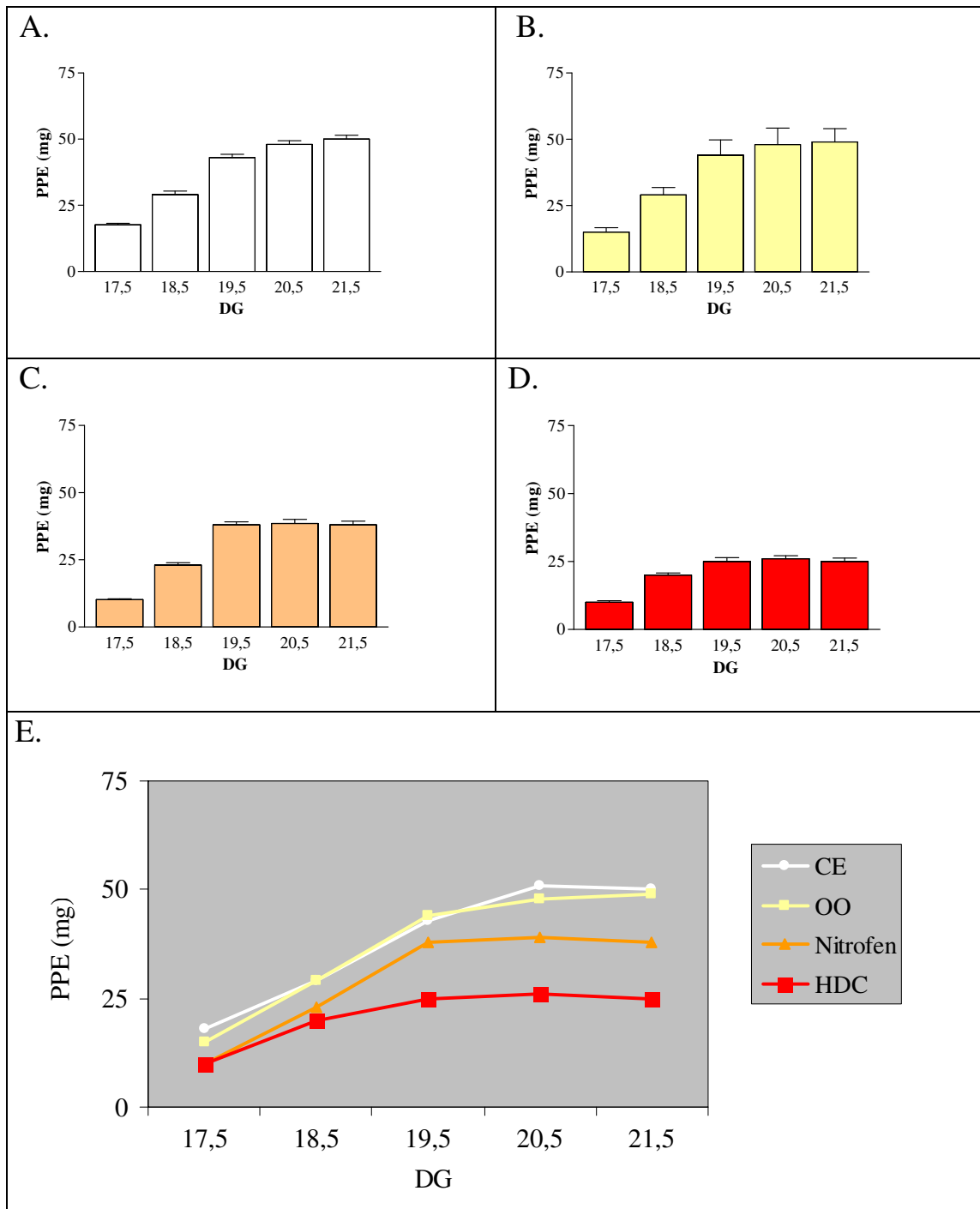


Figura 8- Histogramas das médias \pm desvio padrão dos pesos pulmonares esquerdos (PPE), em mg, dos grupos CE (A) , OO (B), nitrofen sem HDC (C) e com HDC (D), nos respectivos dias gestacionais (DG). Curva evolutiva geral (E) da média dos pesos pulmonares esquerdos dos fetos.

Tabela 5- Relação peso pulmonar total e o peso corporal dos fetos (PP/PC) dos grupos CE, OO, nitrofen sem HDC e com HDC nos respectivos dias gestacionais (DG), cujos valores foram expressos por médias \pm desvio padrão.

DG	Grupo Controle Externo	Grupo Óleo de Oliva	Grupo Nitrofen	
			Sem HDC	HDC
17,5	0,0324 \pm 0,0043	0,0331 \pm 0,0054	0,0224 \pm 0,0031	0,0211 \pm 0,0039
18,5	0,0337 \pm 0,0058	0,0367 \pm 0,0034	0,0298 \pm 0,0038 ^{*a**b}	0,0278 \pm 0,0046 ^{**ab}
19,5	0,0325 \pm 0,0031	0,0357 \pm 0,0034 ^{*a}	0,0300 \pm 0,0035 ^{**a*b}	0,0243 \pm ,0011 ^{**abc}
20,5	0,0269 \pm 0,0067	0,0279 \pm 0,0030	0,0229 \pm 0,0029 ^{**ab}	0,0178 \pm 0,0023 ^{**ab*c}
21,5	0,0225 \pm 0,0031	0,0249 \pm 0,0023 ^{*a}	0,0180 \pm 0,0025 ^{**ab}	0,0144 \pm ,0023 ^{**abc}

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; ^a Referente ao grupo CE, ^b Referente ao grupo OO; ^c Referente ao grupo nitrofen sem HDC, ^d Referente ao grupo nitrofen com HDC.

Os valores de média \pm desvio padrão, acima citados, constam nos anexos 1 a 5 CE; anexos 6 a 10 OO; anexos 11 a 15 nitrofen sem HDC e anexos 16 a 20 com HDC.

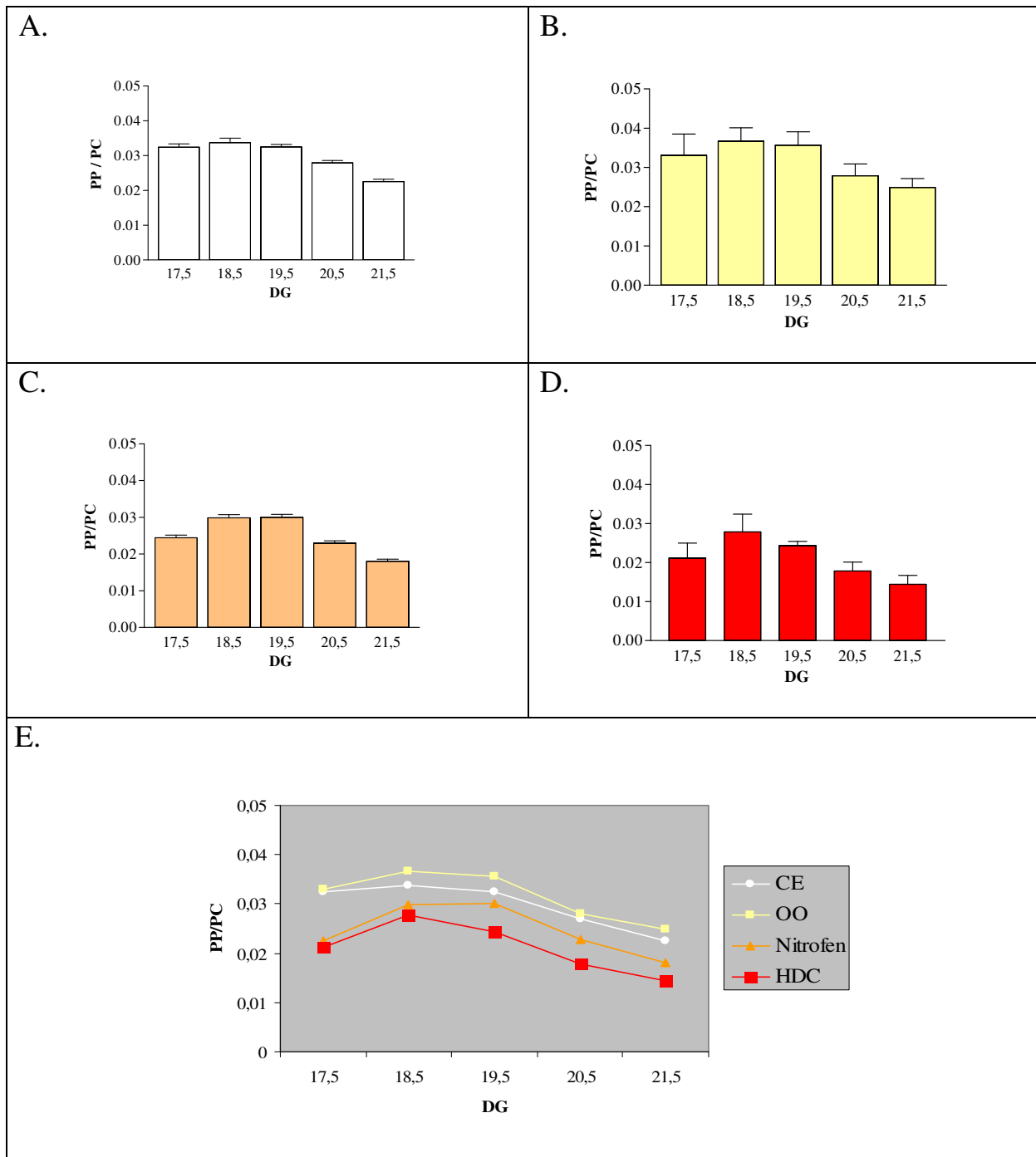


Figura 9- Histogramas de médias \pm desvio padrão da relação peso pulmonar total (PP/PC) e o peso corporal dos fetos dos grupos CE (A), OO (B), nitrofen sem HDC (C) e com HDC (D), nos respectivos dias gestacionais (DG). Curva evolutiva geral (E) da relação entre o peso pulmonar total e o peso corporal dos fetos.

Tabela 6- Volume pulmonar total (VPT) dos fetos, em μl , dos grupos CE, OO, nitrofen sem HDC e com e HDC nos respectivos dias gestacionais (DG), cujos valores foram expressos por médias \pm desvio padrão.

DG	Grupo Controle Externo	Grupo Óleo de Oliva	Grupo Nitrofen	
			Sem HDC	HDC
17,5	49 \pm 7,5	42 \pm 6,7 ^{*a}	27 \pm 4,0 ^{**ab}	26 \pm 5,8 ^{**ab}
18,5	78 \pm 16,2	86 \pm 9,6	59 \pm 9,6 ^{**ab}	56 \pm 8,3 ^{**abc}
19,5	123 \pm 11,1	127 \pm 17	101 \pm 14,9 ^{**ab}	74 \pm 14,8 ^{**abc}
20,5	143 \pm 34,1	137 \pm 14,5	100 \pm 16 ^{**ab}	76 \pm 11,8 ^{**ab*c}
21,5	143 \pm 16,4	140 \pm 11,8	97 \pm 18,7 ^{**ab}	76 \pm 13,9 ^{**abc}

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; ^a Referente ao grupo CE, ^b Referente ao grupo OO; ^c Referente ao grupo nitrofen sem HDC, ^d Referente ao grupo nitrofen com HDC.

Os valores de média \pm desvio padrão, acima citados, constam nos anexos 1 a 5 CE; anexos 6 a 10 OO; anexos 11 a 15 nitrofen sem HDC e anexos 16 a 20 com HDC.

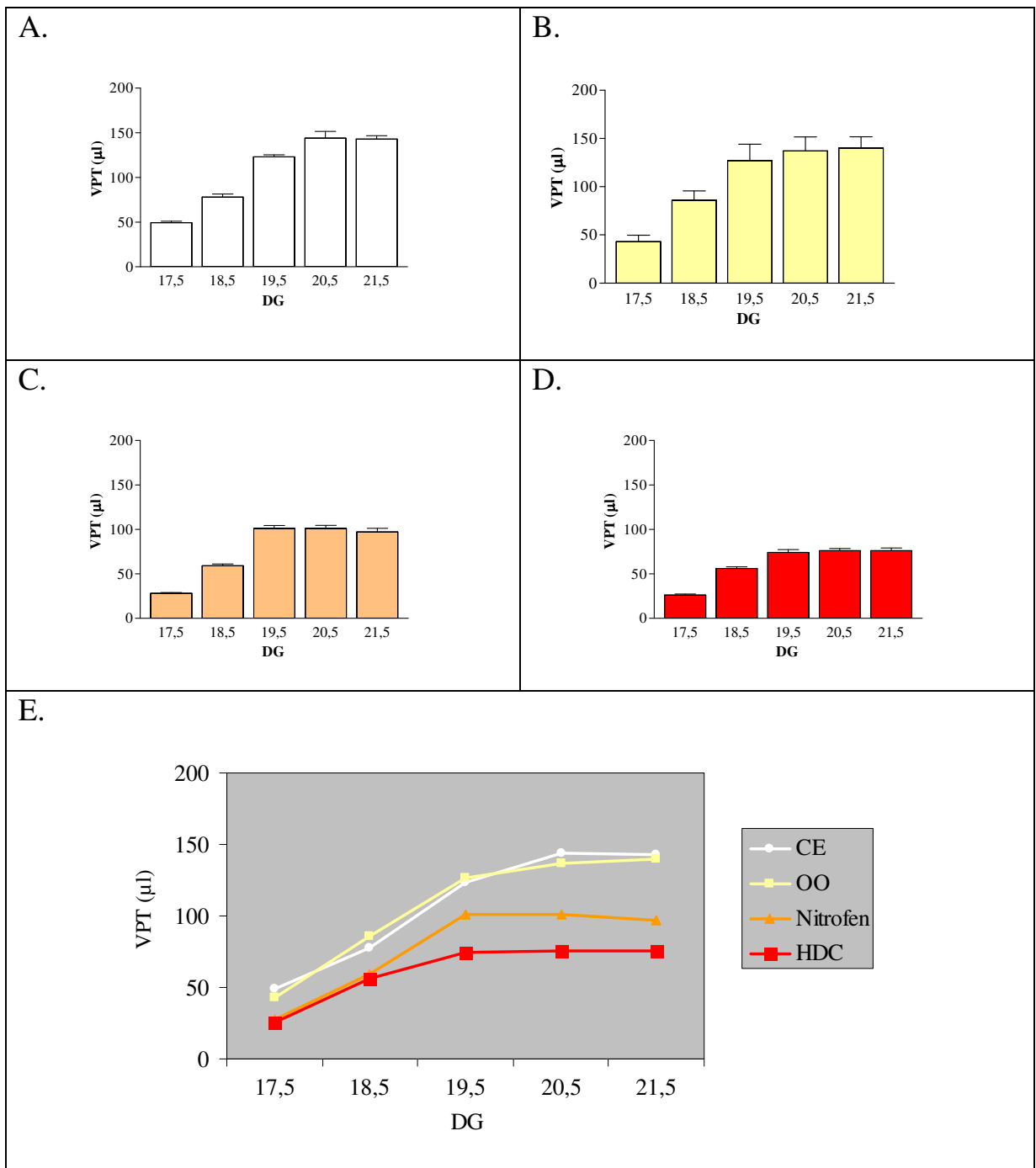


Figura 10- Histogramas das médias \pm desvio padrão volume pulmonar total (VPT) dos fetos, em μl , dos grupos CE (A), OO (B), nitrofen sem HDC (C) e com HDC (D), nos respectivos dias gestacionais (DG). Curva evolutiva geral volume pulmonar total dos fetos (E).

Tabela 7- Volume pulmonar esquerdo dos fetos (VPE), em μl , dos grupos CE, OO, nitrofen sem HDC e com e HDC nos respectivos dias gestacionais (DG), cujos valores foram expressos por médias \pm desvio padrão.

DG	Grupo Controle Externo	Grupo Óleo de Oliva	Grupo Nitrofen	
			Sem HDC	HDC
17,5	16 \pm 2,8	13 \pm 1,9 ^{*a}	7 \pm 2,5 ^{**ab}	9 \pm 3,4 ^{**ab}
18,5	27 \pm 5,8	28 \pm 2,9	21 \pm 3,8 ^{**ab}	19 \pm 3,2 ^{**ab}
19,5	41 \pm 5,7	40 \pm 10,8	36 \pm 5,8	24 \pm 6,6 ^{**abc}
20,5	49 \pm 12,8	46 \pm 6,3	36 \pm 6,3 ^{**a*b}	23 \pm 5,7 ^{**abc}
21,5	48 \pm 6,4	47 \pm 4,6	36 \pm 5,6 ^{**ab}	23 \pm 5,3 ^{**abc}

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; ^a Referente ao grupo CE, ^b Referente ao grupo OO; ^c Referente ao grupo nitrofen sem HDC, ^d Referente ao grupo nitrofen com HDC.

Os valores de média \pm desvio padrão, acima citados, constam nos anexos 1 a 5 CE; anexos 6 a 10 OO; anexos 11 a 15 nitrofen sem HDC e anexos 16 a 20 com HDC.

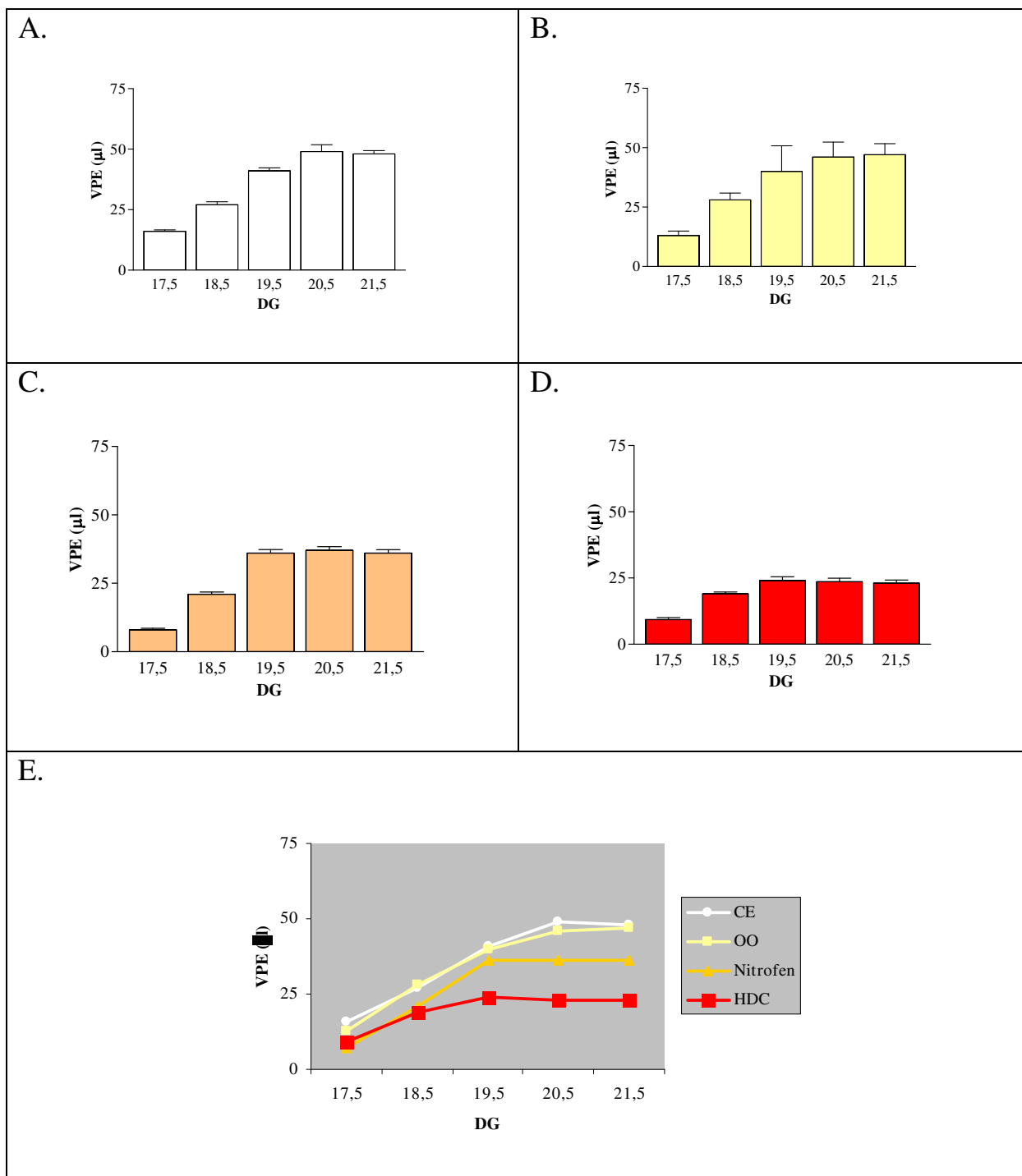


Figura 11- Histogramas das médias \pm desvio padrão volume pulmonar esquerdo dos fetos (VPE), em μl , dos grupos CE (A), OO (B), nitrofen sem HDC (C) e com HDC (D), nos respectivos dias gestacionais (DG). Curva evolutiva geral volume pulmonar esquerdo dos fetos (E).

5.2- Análise Histométrica

Os resultados de densidades dos parênquimas e volumes pulmonares dos parênquimas esquerdo (Vpae), em μl , dos grupos CE, OO, nitrofen sem HDC e com HDC nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5 encontram na Tabela 8 e Figura 12.

Tabela 8- Densidade de parênquima e volume da área de parênquima pulmonar esquerdo dos fetos (Vpae), em μl , dos grupos CE, OO, nitrofen sem HDC e com HDC, nas respectivas idades gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5 dias, cujos valores foram expressos por médias \pm desvio padrão.

DG	Grupo Controle Externo		Grupo Óleo de Oliva		Grupo Nitrofen			
	DAP	Vpae	DAP	Vpae	Sem HDC		HDC	
					DAP	Vpae	DAP	Vpae
17,5	0,84 \pm 0,06	1337 \pm 92	0,89 \pm 0,04	1135 \pm 51 ^{**a}	0,84 \pm 0,05	671 \pm 41 ^{**ab}	0,88 \pm 0,05	790 \pm 41 ^{**ab*c}
18,5	0,77 \pm 0,05	2074 \pm 132 ^{**b}	0,88 \pm 0,06	2454 \pm 175	0,80 \pm 0,05	1671 \pm 104 ^{**b}	0,85 \pm 0,05	1615 \pm 86 ^{**b}
19,5	0,66 \pm 0,06	2709 \pm 265	0,75 \pm 0,05	3072 \pm 203	0,67 \pm 0,05	2432 \pm 197 ^{**ab}	0,80 \pm 0,05	1925 \pm 118 ^{**ab}
20,5	0,063 \pm 0,06	3132 \pm 285	0,63 \pm 0,05	2906 \pm 250 ^{**a}	0,53 \pm 0,06	2416 \pm 195 ^{**ab}	0,80 \pm 0,05	1928 \pm 125 ^{**ab}
21,5	0,49 \pm 0,10	2348 \pm 490	0,58 \pm 0,07	2704 \pm 314 ^{**a}	0,55 \pm 0,10	2091 \pm 261 ^{**ab}	0,78 \pm 0,05	1804 \pm 113 ^{**ab}

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; ^a Referente ao grupo CE, ^b Referente ao grupo OO; ^c Referente ao grupo nitrofen sem HDC, ^d Referente ao grupo nitrofen com HDC.

Resultados dos cálculos de contagem do parênquima, espaços aéreos e Vpae, acima citados, constam nos anexos 21 a 26.

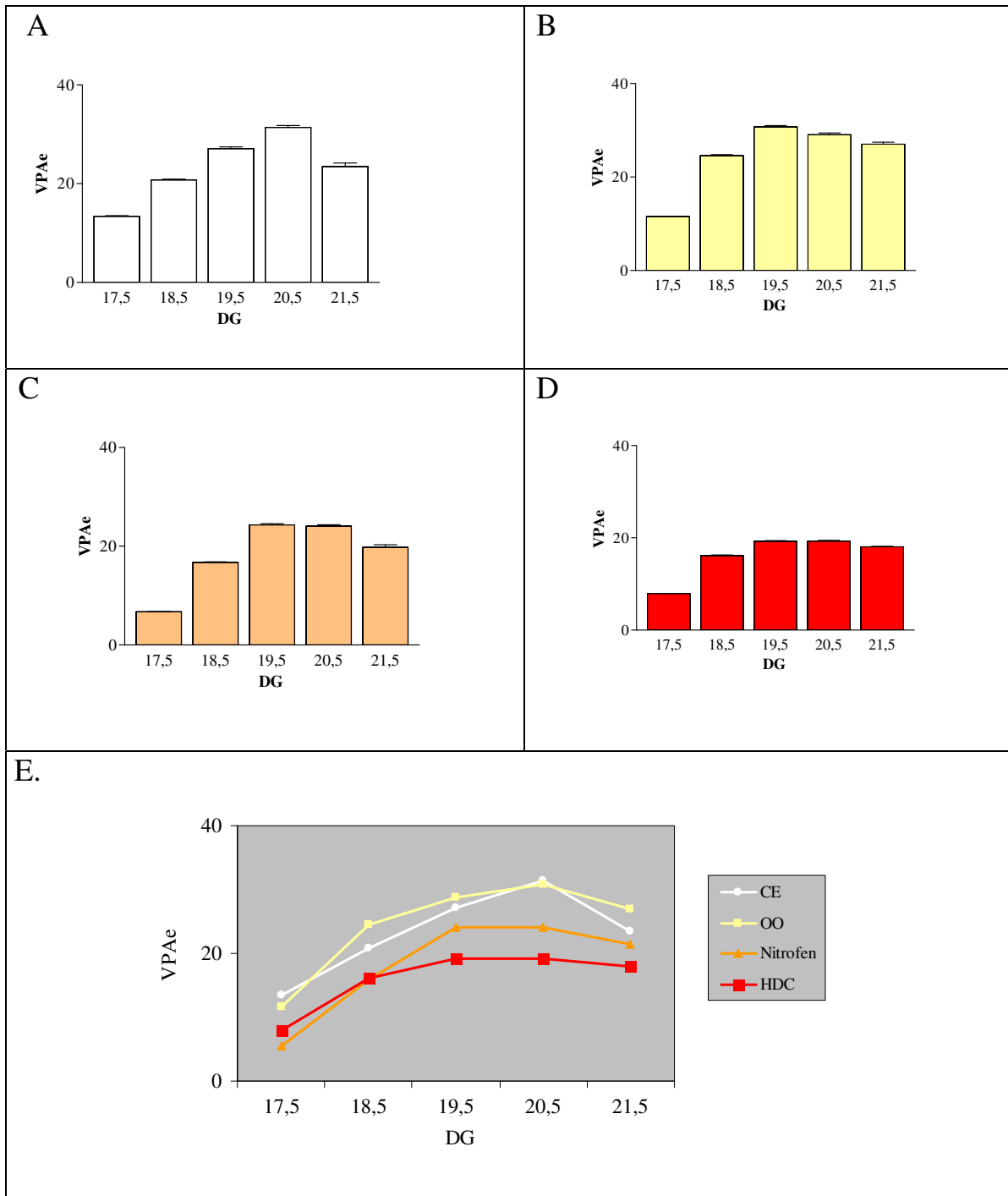


Figura 12- Histogramas das médias \pm desvio padrão de volume da área de parênquima pulmonar esquerdo dos fetos (VPAe) dos grupos CE (A), OO (B), nitrofen sem HDC (C) e com HDC (D), nos respectivos dias gestacionais (DG). Curva evolutiva geral volume pulmonar esquerdo dos fetos (E).

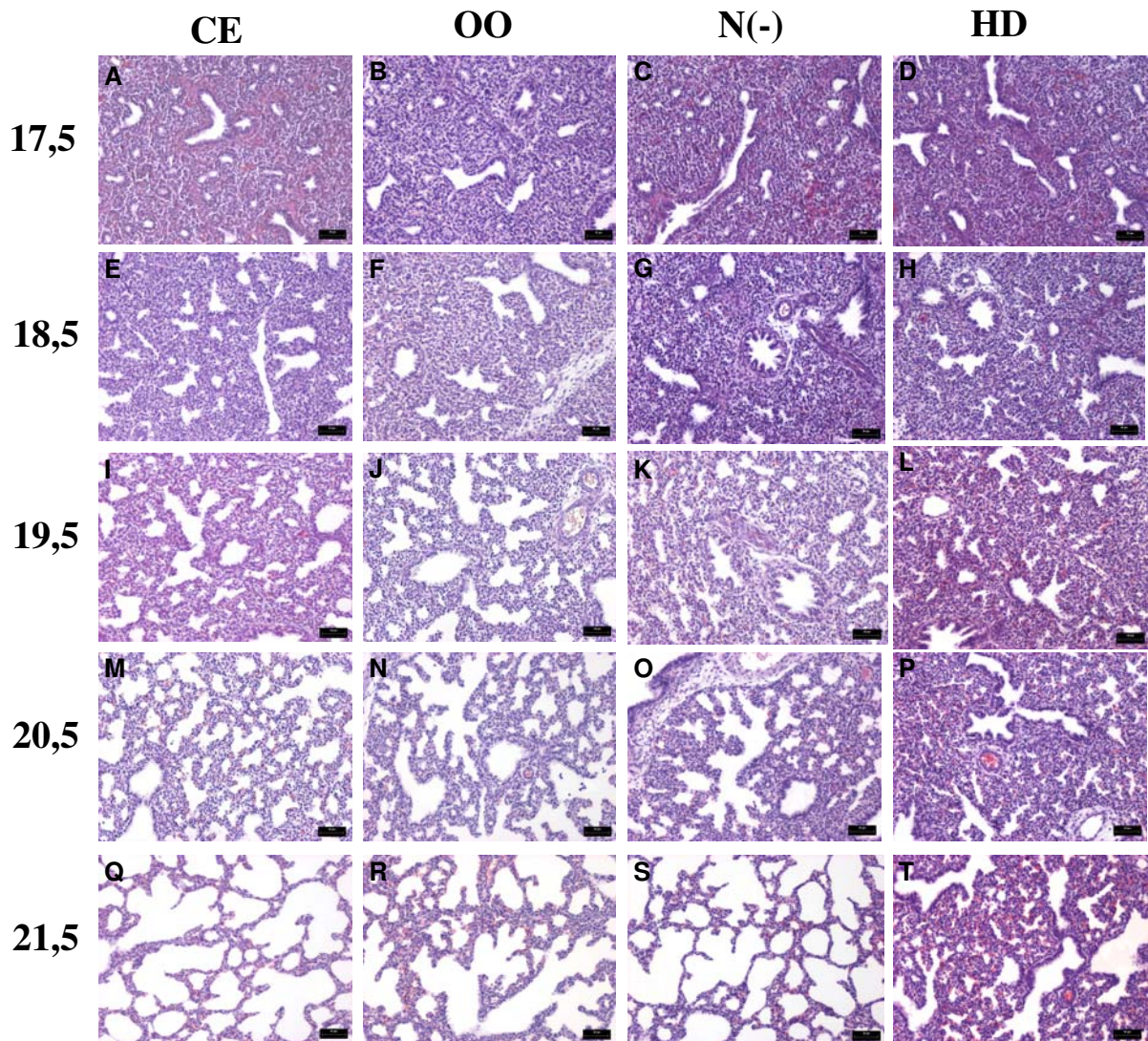


Figura 13- Fotomicrografias de pulmões fetais dos grupos: controle externo (CE), óleo de oliva (OO), nitrofen sem HDC [N(-)] e com HDC nos respectivos dias gestacionais 17,5; 18,5; 19,5; 20,5 e 21,5. Há diminuição do espaço aéreo nas imagens L P e T, demonstrando a hipoplasia pulmonar no grupo HDC, presente nas idades gestacionais mais tardias. Coloração H&E, aumento 100X.

5.3- Análise Imunoistoquímica

Tabela 9- Contagem de pontos imunomarcados positivamente, nos pulmões esquerdos dos fetos, para os receptores VEGFR-1 (flt-1) dos grupos CE, OO, nitrofen sem HDC e com HDC, nos respectivos dias gestacionais (DG), cujos valores foram expressos por médias \pm desvio padrão.

DG	Grupo Controle Externo	Grupo Óleo de Oliva	Grupo Nitrofen	
			Sem HDC	HDC
17,5	27 \pm 4 ^{**bcd}	33 \pm 6 ^{**cd}	56 \pm 7	38 \pm 7 ^{**c}
18,5	27 \pm 4 ^{**bcd}	33 \pm 6 ^{**cd}	54 \pm 6	46 \pm 8 ^{**c}
19,5	27 \pm 5 ^{**bcd}	31 \pm 8 ^{**cd}	46 \pm 6 ^{**d}	54 \pm 9
20,5	27 \pm 5 ^{**b*cd}	34 \pm 5 ^{*c**d}	45 \pm 5 ^{*d}	48 \pm 7
21,5	26 \pm 4 ^{**bc}	32 \pm 8 ^{**cd}	44 \pm 7 ^{*d}	47 \pm 4

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; ^a Referente ao grupo CE, ^b Referente ao grupo OO; ^c Referente ao grupo nitrofen sem HDC, ^d Referente ao grupo nitrofen com HDC.

Resultados dos cálculos de contagem de 50 pontos imunomarcados positivamente para os receptores VEGFR-1 (flt-1) constam nos anexos 27 a 30.

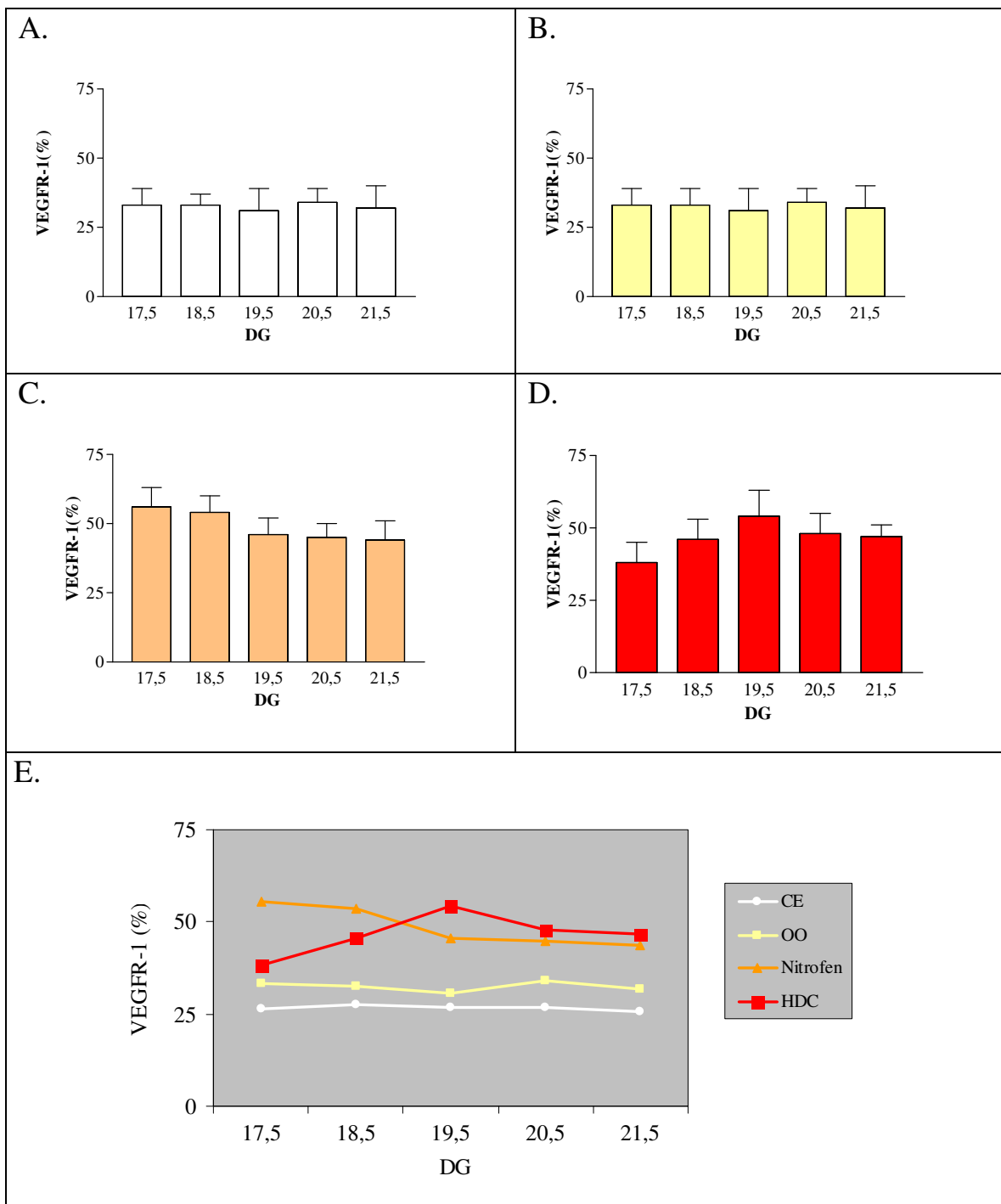


Figura 14- Histogramas das médias \pm desvio padrão de pontos imunomarcados positivamente, nos pulmões esquerdos dos fetos (%) para os receptores VEGFR- 1 (flt-1) dos fetos, dos grupos CE (A), OO (B), nitrofen sem HDC (C) e com HDC (D), nos respectivos dias gestacionais (DG). Curva evolutiva geral destes pontos para os receptores VEGFR- 1 (E).

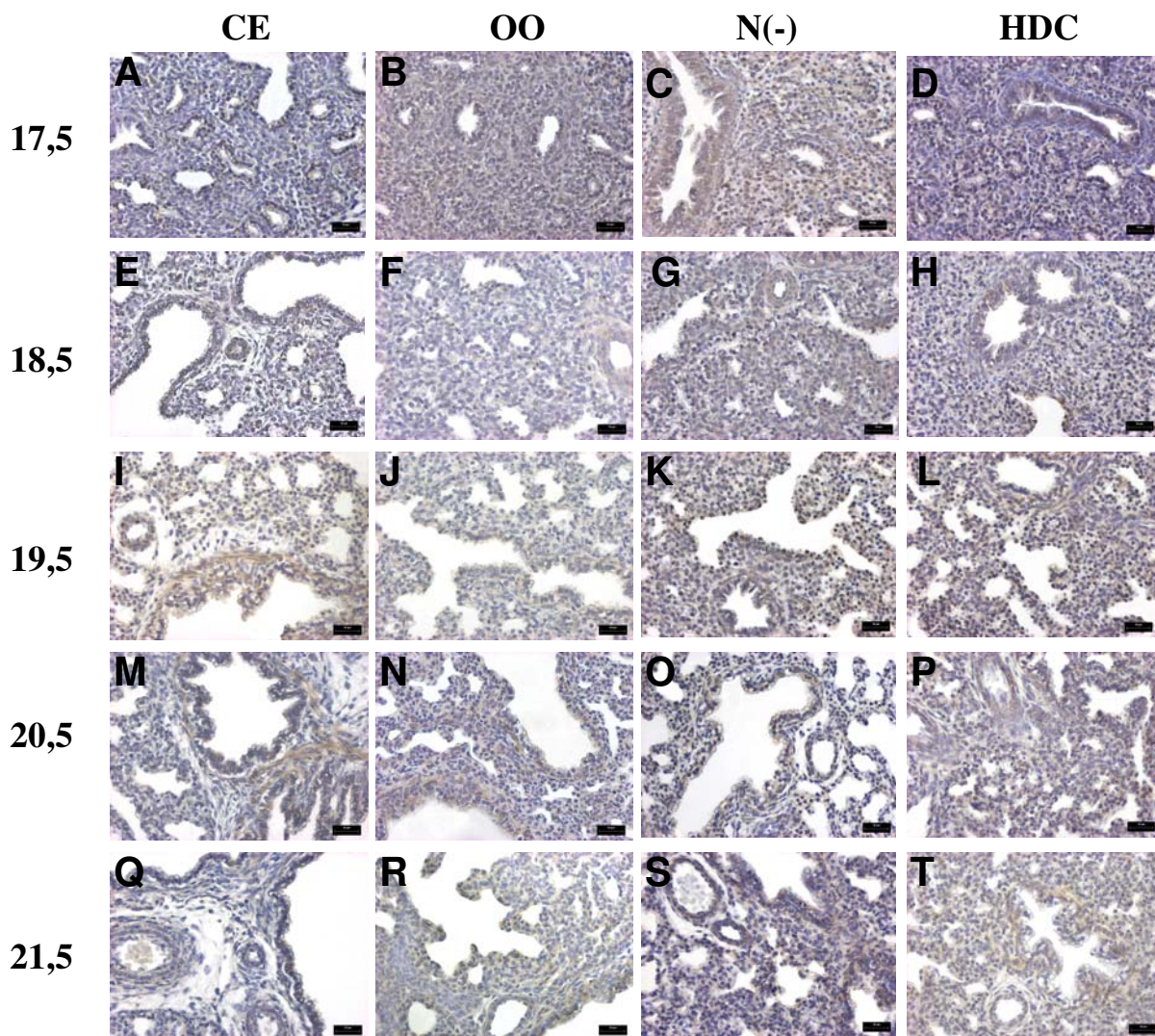


Figura 15- Fotomicrografias de pulmões fetais imunomarcados positivamente para receptores VEGFR-1 (flt-1) nos grupos: controle externo (CE), óleo de oliva (OO), nitrofen sem HDC [N(-)] e com HDC nos respectivos dias gestacionais 17,5; 18,5; 19,5; 20,5 e 21,5. Observa-se a imunomarcção acentuada dos receptores VEGFR-1 nas idades gestacionais mais tardias (imagens L, P e T) do grupo HDC. Contra coloração Hematoxilina de Harris, aumento 200X.

Tabela 10- Contagem de pontos imunomarcados positivamente, nos pulmões esquerdos dos fetos, para os receptores VEGFR-2 (flk-1) dos grupos CE, OO, nitrofen sem HDC e com HDC, nos respectivos dias gestacionais (DG), cujos valores foram expressos por médias \pm desvio padrão.

DG	Grupo Controle Externo	Grupo Óleo de Oliva	Grupo Nitrofen	
			Sem HDC	HDC
17,5	27 \pm 6 ^{**bcd}	34 \pm 7 ^{**cd}	57 \pm 9	46 \pm 7 ^{**c}
18,5	36 \pm 7 ^{**c*d}	36 \pm 7 ^{**cd}	49 \pm 7	45 \pm 6 ^{**c}
19,5	34 \pm 7 ^{**cd}	30 \pm 5 ^{**acd}	49 \pm 7	49 \pm 8
20,5	37 \pm 6 ^{**d}	28 \pm 5 ^{**acd}	34 \pm 6 ^{*a**d}	43 \pm 5
21,5	27 \pm 5 ^{**d}	27 \pm 5 ^{**d}	28 \pm 5 ^{**d}	43 \pm 8

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; ^a Referente ao grupo CE, ^b Referente ao grupo OO; ^c Referente ao grupo nitrofen sem HDC, ^d Referente ao grupo nitrofen com HDC.

Resultados dos cálculos de contagem de 50 pontos imunomarcados positivamente para os receptores VEGFR-2 (flk-1) constam nos anexos 31 a 34.

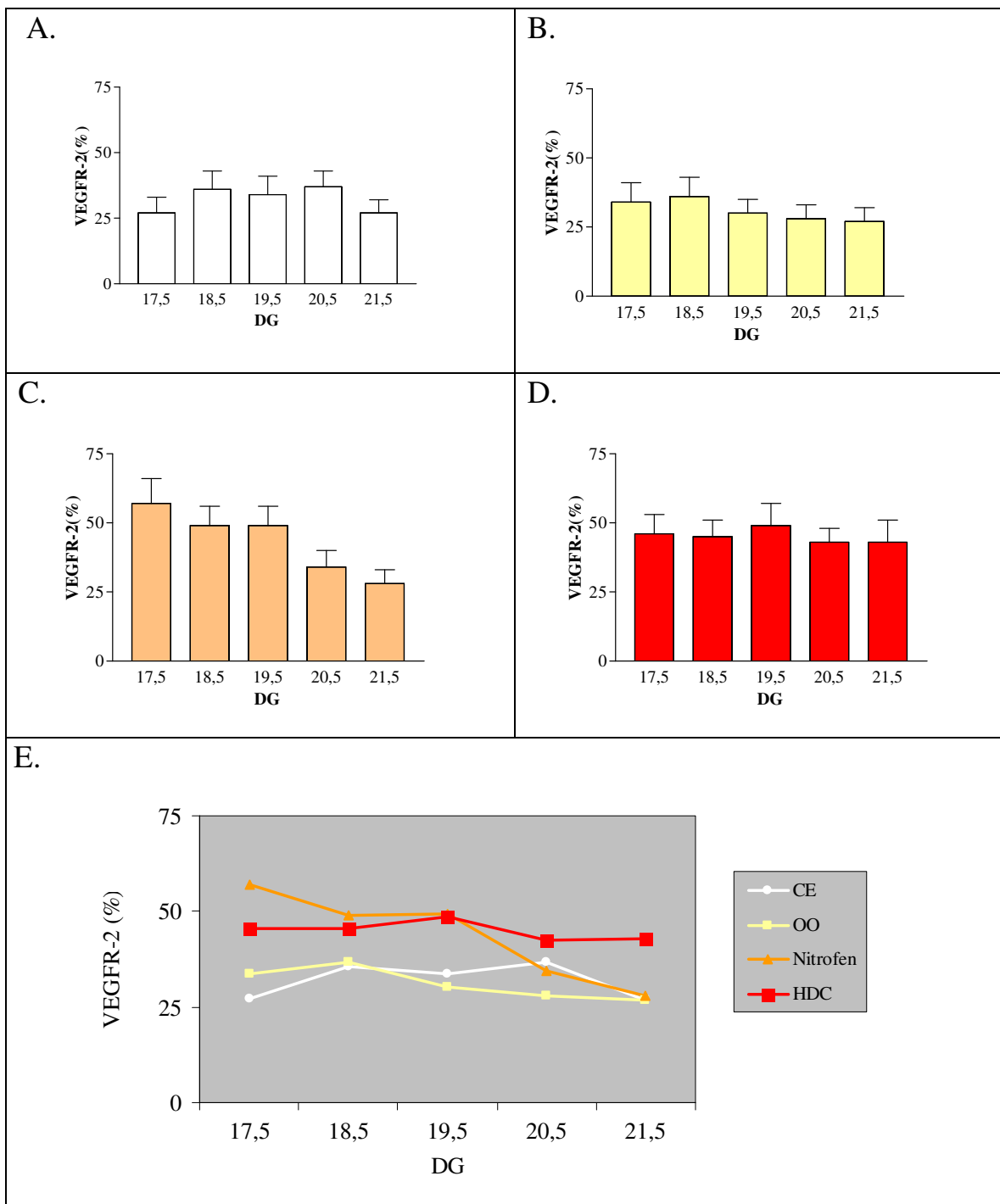


Figura 16- Histogramas das médias \pm desvio padrão de pontos imunomarcados positivamente, nos pulmões esquerdos dos fetos (%) para os receptores VEGFR- 2 (flk-1) dos fetos, dos grupos CE (A), OO (B), nitrofen sem HDC (C) e com HDC (D), nos respectivos dias gestacionais (DG). Curva evolutiva geral destes pontos para os receptores VEGFR- 2 (E).

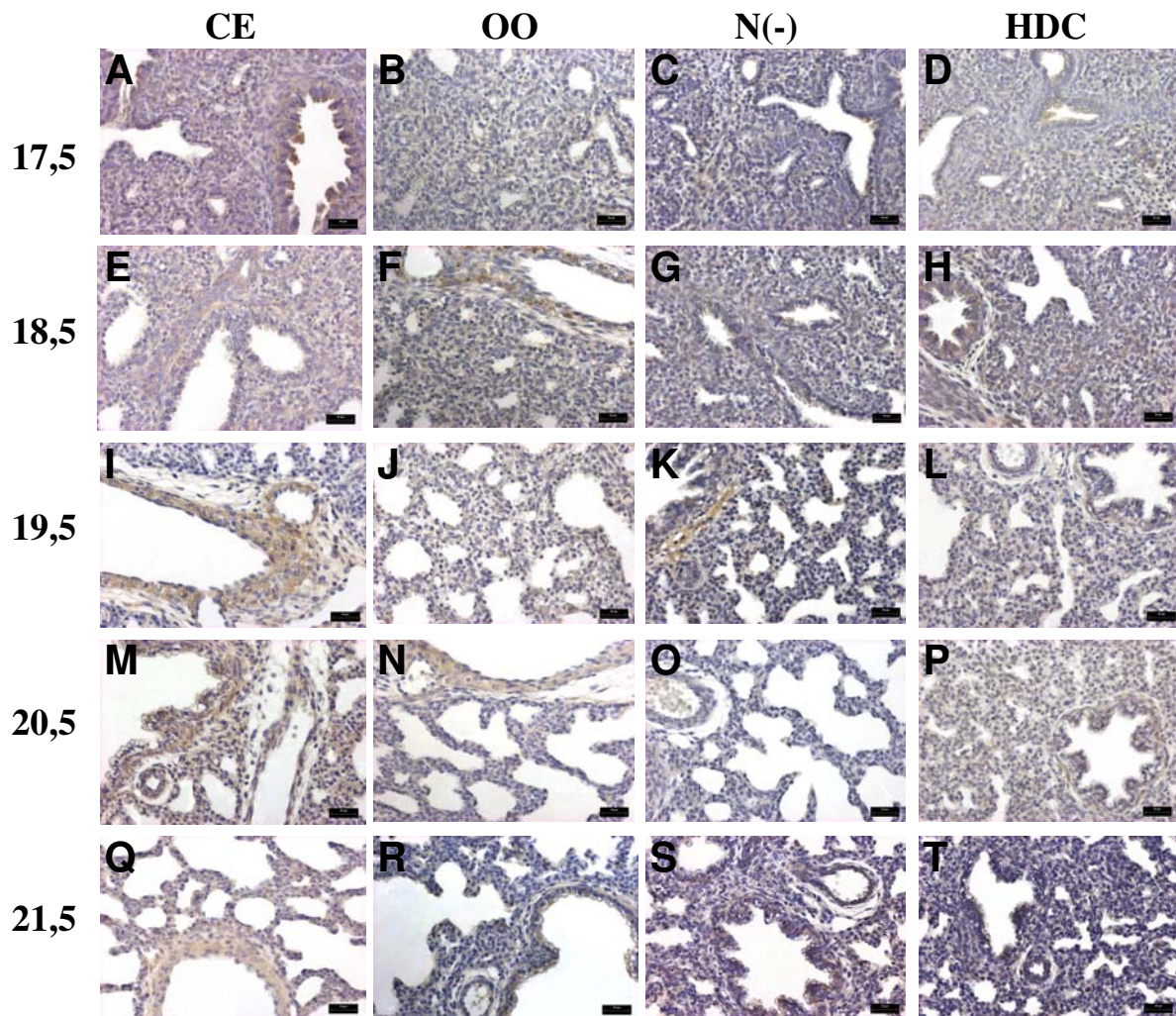


Figura 17- Fotomicrografias de pulmões fetais imunomarcados positivamente para receptores VEGFR-2 (flk-1) nos grupos: controle externo (CE), óleo de oliva (OO), nitrofen sem HDC [N(-)] e com HDC nos respectivos dias gestacionais 17,5; 18,5; 19,5; 20,5 e 21,5. Observa-se imunomarcção acentuada dos receptores VEGFR-2 nas idades gestacionais mais tardias (imagens L, P e T) do grupo HDC. Contra coloração Hematoxilina de Harris, aumento 200X.

6- DISCUSSÃO

HDC continua sendo uma doença pulmonar congênita grave. Estima-se que aproximadamente 1 em 2000 concepções com fetos portadores de HDC não chegue a termo por complicações associadas e, apesar dos avanços terapêuticos, a mortalidade (32 a 62%) continua alta devido à hipoplasia e a hipertensão pulmonares (HP) (Harrison et al., 1994; Harding e Thornburn, 1994; Skari et al., 2000; Stege et al., 2003).

As possibilidades terapêuticas para HDC consistem em tratamentos pré, peri e pós-natais e envolvem o ato cirúrgico e o tratamento clínico onde pode ser utilizado surfactante pulmonar, ventilação com óxido nítrico, ventilação de alta frequência e oxigenação por membrana extra-corpórea (ECMO) com intuito de minimizar a gravidade da HP (Langer, 1998; Sydorak et al., 2003).

Os modelos animais cirúrgicos ou toxicológicos de estudo de HDC vêm contribuindo para a compreensão tanto dos mecanismos genéticos quanto dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da doença e de suas complicações.

O primeiro modelo toxicológico surgiu da observação de que embriões de ratos deficientes em retinol desenvolvem HDC (Andersen, 1941; Warkany e Roth, 1948). Esses estudos mostraram que as anomalias eram reduzidas em frequência ou até mesmo eliminadas com a administração de retinol, com melhores resultados quando a terapia era feita no 10º e 11º dia gestacional (Andersen, 1941; Wilson et al., 1953). Posteriormente, vários teratógenos se mostraram capazes de induzir a formação da HDC (Gray et al., 1982; Cappon et al., 2003; Gupta et al., 2003), mas o mais utilizado é o herbicida nitrofen (2,4-dicloro-4'-nitrodifenil éter) (Kluth et al., 1990; Allan e Greer, 1997).

Iritani (1984) foi o pioneiro na utilização de nitrofen como modelo experimental para estudar a embriogênese da HDC pela administração oral do herbicida em camundongos e correlacionou a causa do defeito com alterações na inervação do nervo frênico.

Tenbrinck et al. (1990) avaliaram a presença de hipoplasia pulmonar utilizando o mesmo modelo em ratos e questionam se na HDC existe hipoplasia primária ou seja, o herbicida induziria a diminuição celular desde a embriogênese ou seria secundária a compressão pulmonar por órgãos intra-torácicos.

Kluth et al. (1990) qualificaram o modelo e relatam que na dose de 100mg de nitrofen administrado por gavagem, no 9º dia de gestação obtiveram HDC do lado esquerdo e após o 10º dia ocorre mais HDC do lado direito sendo que o total de HDC do lado esquerdo obtido foi de 24% dos fetos expostos ao herbicida.

Kluth et al. (1993) definiram as mudanças morfológicas da HDC e a hipoplasia pulmonar deste modelo utilizando microscopia de varredura. Morfológicamente os autores descreveram que a região do defeito diafragmático era uma entidade distinta e estava separada de parte do diafragma onde os canais pleuroperitoneais estavam localizados e concluíram que as aberturas pleuroperitoneais não são as precursoras do defeito diafragmático. Os mesmos autores acreditam que a hipoplasia pulmonar é de início precoce (período embrionário do desenvolvimento pulmonar) e é secundária ao crescimento hepático e de vísceras dentro do tórax.

A causa da hipoplasia pulmonar na HDC é controversa e ainda não está esclarecida. Diferente do que acredita Kluth et al. (1993) de que a hipoplasia pulmonar seja secundária no modelo de nitrofen, Alfonso et al. (1996) analisaram a maturidade bioquímica pulmonar e verificaram que a exposição ao nitrofen levou a diminuição morfológica da relação PP/PC e bioquímica da relação proteína/DNA significando menor tamanho das células pulmonares e concluíram que a hipoplasia neste modelo é primária como foi inicialmente proposto por Iritani (1984).

Nossos resultados confirmam os resultados do método proposto por Kluth et al. (1990). Obtivemos 37% de HDC (100/270 do total de fetos expostos ao herbicida), esses resultados foram melhores que os próprios autores que obtiveram 24% de HDC do lado esquerdo.

A colheita de fetos em dias gestacionais seriados (17.5, 18.5, 19.5, 20.5 e 21.5) permitiu o estudo de três fases do desenvolvimento pulmonar fetal do rato. Pringle (1986) descreve o modelo das várias fases de desenvolvimento pulmonar humano e relaciona com as fases de desenvolvimento das de outros mamíferos. Para o desenvolvimento pulmonar de fetos de ratos os dias gestacionais do nosso estudo correspondem às fases pseudoglandular

(17.5 e 18.5), canalicular (18.5, 19.5 e 20.5) e sacular (20.5 e 21.5); esses achados estão de acordo com as fases descritas por Pringle (1986).

Verificamos que durante o desenvolvimento pulmonar houve aumento progressivo do PC, PPT, PPE, VPT e VPE com diminuição da relação PP/PC nos fetos CE e OO, mas os fetos expostos ao nitrofen tiveram suas relações diminuídas, especialmente os portadores de HDC ($p < 0.05$), resultados esses que são similares aos de Alfonso et al. (1996). Notamos especialmente que a partir do dia 18,5 e 19,5 as diferenças de variáveis aumentam especialmente a relação PPT, PPE e PP/PC no grupo exposto ao nitrofen. Essa relação traduz a dimensão do pulmão é uma medida de hipoplasia pulmonar, a partir da fase canalicular, os fetos do grupo nitrofen com e sem HDC são menores. Além disso, os volumes dos parênquimas pulmonares do lado esquerdo (VPAe) também são menores que os CE e OO o que indica que a hipoplasia pulmonar é primária como demonstra na igualdade de VPAe no grupo nitrofen. No entanto, os fetos nitrofen com HDC a hipoplasia foi maior devido ao comprometimento do crescimento pulmonar pela presença dos órgãos abdominais, geralmente o fígado, dentro tórax..

Nós também observamos que os grupos CE e OO foram muito semelhantes em relação a comparações das variáveis em relação ao tempo gestacional. Acreditamos que as pequenas diferenças encontradas nesses grupos para mais ou para menos pode significar o stress oferecido a rata ao se administrar o óleo de oliva ou ainda, pode ter havido uma oferta nutricional extra de gordura a rata, já que o óleo não é parte da ingesta normal da ração destes animais. Além do mais, nenhum dos autores que utilizam o modelo de nitrofen apresenta dado comparando um possível grupo CE, talvez por acreditarem que o real grupo controle seja apenas o grupo OO.

Devido à semelhança fenotípica entre os modelos animais de HDC induzida pelo nitrofen e de deficiência de retinol foi feita a hipótese de que o herbicida alteraria a homeostase do ácido retinóico (Greer et al., 2003; Thébaud et al., 1999). Tem sido demonstrado que o nitrofen inibe a sinalização de ácido retinóico em embriões e inibe, no diafragma, a função da retinaldesidrogenase 2 (RALDH2), enzima chave necessária para a transformação do retinal em ácido retinóico (AR), o composto ativo nos tecidos (Mey et al., 1999; Noble et al., 2007).

No mesmo modelo, a administração de retinol e AR durante o período crítico para a formação do diafragma (8° a 12° dia de gestação) foi capaz de diminuir significativamente a frequência de HDC nos fetos. Nos animais não tratados foi observado HDC em 54% dos fetos, enquanto nos tratados com retinol esse valor variou de 32 a 53% de acordo com o dia de administração. Já no grupo tratado com AR esse valor variou de 8 a 15%. Portanto, foi observada uma maior diminuição do número de casos de HDC quando usado o AR em comparação ao retinol, o que poderia ser justificado pelo fato de que o retinol necessita ser convertido no tecido pelas reações da qual faz parte a RALDH2, enquanto o AR é o próprio composto ativo (Thébaud et al., 1997; Babiuk et al., 2004).

As anormalidades histológicas na HDC e a conseqüente hipoplasia pulmonar têm sido bem descritas, entretanto pouco é conhecido acerca dos mecanismos moleculares envolvidos. De especial interesse são as alterações que ocorrem na vasculatura pulmonar, pois diversos fatores de crescimento estão diminuídos e estão envolvidos na gênese da HP.

Tenbrinck et al. (1992) avaliaram no modelo de HDC com nitrofen que as arteríolas, ao nível dos bronquíolos respiratórios e das vias respiratórias maiores, apresentavam aumento da espessura da parede (muscularização) expresso pela porcentagem de seus diâmetros externos e esta muscularização se estende para as artérias periféricas pulmonares.

O VEGF é o principal fator estimulador da angiogênese que atua na indução de mitose e migração de células endoteliais vasculares. Além de promover a angiogênese e neovascularização é também um fator de sobrevivência para vasos sanguíneos recém formados (Leung et al., 1989; Alon et al., 1995; Larrivee e Karsan, 2002).

Seus receptores, VEGFR-1(Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1) em ratos e KDR em humanos possuem atividade tirosina-kinase agindo na abertura de canais de Ca^{+2} e estão localizados nas membranas das células endoteliais com exceção de uma forma solúvel do VEGFR-1 (sVEGFR-1) (De Vries et al., 1992; Quinn et al., 1993; Hewett et al., 1996).

O VEGF atua via receptores VEGFR-2 (Flk-1/KDR) para promover a diferenciação e proliferação das células endoteliais e formação da vasculatura primitiva. O VEGFR-2 é importante para a proliferação e migração de células endoteliais, sendo

expresso em células endoteliais de vasos linfáticos durante o desenvolvimento (Shalaby et al., 1995; Wilting et al., 1997).

As alterações no VEGF e seus receptores causam um distúrbio da angiogênese levando a uma remodelação prejudicial das pequenas artérias. Isto posto, demonstrou-se que o VEGF glicoproteína está aumentado na HDC e na hipertensão pulmonar, entretanto outros estudos demonstraram diminuição do VEGF na HDC induzida pelo nitrofen (Oue et al., 2000; Chang et al., 2004).

Não há um consenso se o VEGF está aumentado ou diminuído na HDC. Okazaki et al. (1997) utilizando o mesmo modelo, encontraram que a expressão do VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) estava diminuída na HDC e sugerem que mecanismos envolvidos nos seus receptores possam contribuir para aumentar a HP na doença. Shehata et al. (1999) encontraram aumento da expressão e VEGF nos pulmões de neonatos com CDH que faleceram por HP grave.

Oue et al. (2002) relatam que houve aumento de VEGF no modelo de CDH induzido pelo nitrofen, mas esse aumento não pode ser excluído da própria ação tóxica do nitrofen, por outro lado, no mesmo modelo, Chang et al. (2004) relatam diminuição do VEGF. Hara et al. (2005) causando traqueo-oclusão em fetos de ratos encontraram aumento de VEGF no tecido pulmonar.

Nossos resultados demonstraram que a imunomarcagem do receptor VEGFR-1 nestas três fases do desenvolvimento fetal teve a tendência de se manter estável nos grupos CE e OO e estava aumentada nos fetos expostos ao nitrofen, no entanto, nos fetos com HDC esta marcação foi maior que todos os demais grupos ($p < 0.005$). Já a expressão do receptor VEGFR-2 mostrou uma queda progressiva no grupo nitrofen sem HDC e marcações similares nos grupos CE e OO, no entanto há um aumento significativo da marcação nos fetos com HDC ($p < 0.005$). Esse aumento persiste na fase canalicular do desenvolvimento fetal, fase de grande vasculogênese, e na fase sacular, pois o espaço da caixa torácica passa a ser mais restrito pela competição entre o crescimento pulmonar e o crescimento hepático que invade o tórax. Nós não encontramos dados similares na literatura sobre o comportamento dos receptores de VEGF na HDC.

Esse aumento para ambos os receptores pode traduzir a imaturidade pulmonar que ocorre na HDC. Como demonstrado previamente, no modelo de HDC utilizando nitrofen ocorre hipoplasia pulmonar primária e pelo fato de ambos os grupos nitrofen apresentarem receptores VEGFR aumentados, podemos inferir que há um componente tóxico do herbicida que interfere no modelo. Essa explicação seria similar a explicação que Que et al. (2002) encontrou para o aumento de VEGF no mesmo modelo. Há que se ressaltar, que embora possa ter havido um componente tóxico sobre o tecido pulmonar do grupo nitrofen, os pulmões com HDC tiveram maior imunomarcagem que todos os demais grupos.

A sinalização por meio do VEGFR-2 produz diversas respostas celulares, incluindo intensos sinais mitogênicos e de sobrevivência para células endoteliais e seus precursores (Waltenberger et al., 1994; Bernatchez et al., 1999), de maneira que o silenciamento dos genes para o VEGFR-2 produz redução ou abolição da vasculogênese em ratos (Shalaby et al., 1995; Shalaby et al., 1997). Já o VEGFR-1 atua no desenvolvimento de vasos sanguíneos modulando negativamente a divisão das células endoteliais, pois coíbe a sinalização pelo VEGFR-2 (Kearney et al., 2002; Roberts et al., 2004). Ratos com silenciamento dos genes para o VEGFR-1 não sobrevivem até o fim da gestação e apresentam hipertrofia e desorganização do leito vascular (Fong et al., 1995). Além disso, os diversos efeitos do VEGF nas células epiteliais e vasculares sugerem que a expressão espaço-temporal do VEGF é importante, não apenas para a formação da rede capilar, mas também para o acompanhamento do crescimento brônquico e alveolização (Jakkula et al., 2000; Hislop, 2002; Yamamoto et al., 2007).

Existe correlação entre o VEGF e a maturação pulmonar fetal. A hipóxia do tecido pulmonar ativa o gene HIF-2 α induzindo a produção do VEGF que por meio de receptores tirosina-quinase (Flt-1 e Flk-1) parece agir sobre os pneumócitos tipo 2 aumentando a produção de surfactante. Ratos com deficiência de VEGF ou que intra-útero sofreram aplicações de anticorpos anti-receptores para VEGF (Flk-1) apresentam Síndrome da Angústia Respiratória (SARA) por deficiência de surfactante. Aplicações intra-útero ou instilação intra-traqueal pós-natal de VEGF estimula a produção de surfactante e protege contra a doença da membrana hialina (Compernelle et al., 2002).

Finalmente, na hipertensão pulmonar o VEGF glicoproteína está aumentado, porém esse aumento parece ser devido à hipóxia a que o tecido pulmonar está submetido (devido à hipertensão pulmonar e menor fluxo) e não que a hipertensão seja devida ao aumento do VEGF, pode-se dizer que o aumento do VEGF é consequência da hipertensão pulmonar e não a causa. Na situação de hipertensão pulmonar parece haver um desarranjo na angiogênese e o aumento do VEGF seria uma tentativa de compensar esse defeito e produzir mais vasos para chegar mais sangue, mas esse mecanismo acaba por piorar a situação porque os vasos passam a ser formados desorganizadamente.

Portanto o aumento da imunomarcção dos receptores de VEGFR-1 e VEGFR-2 no modelo toxicológico de HDC sugerem que estas proteínas estão envolvidas na gênese da hipoplasia pulmonar e do crescimento vascular pulmonar. Nós acreditamos que deva haver um sinergismo entre o aumento de VEGF e dos receptores VEGFR-1 e 2 na doença e seu controle possa ter aplicação clínica no intuito de tentar diminuir o crescimento da camada média vascular. Estas informações podem contribuir para novos estudos que impliquem na interferência no mecanismo de vasculogênese pulmonar na HDC e possíveis tratamento da hipertensão pulmonar no período neonatal.

7- CONCLUSÃO

7.1- Geral

O método de obtenção de HDC por indução toxicológica utilizando o herbicida nitrofen foi válido com obtenção de 37 % (100/270) de fetos com HDC. A hipoplasia pulmonar dos fetos expostos ao herbicida foi considerada primária.

7.2- Específica

7.2.1- Tanto do ponto de vista morfológico quanto do ponto de vista morfométrico e estereológico todas as variáveis foram menores nos fetos de ratas Sprague-Dawley expostos ao nitrofen especialmente nos fetos portadores de HDC que os grupos CE e OO. Estas diferenças são maiores a partir dos dias gestacionais 18,5 e 19,5, notadamente nas fases canalicular e início da fase sacular do desenvolvimento pulmonar.

7.2.2- A determinação e a comparação da imunistoquímica da expressão dos receptores VEGFR-1 foi maior nos fetos expostos ao nitrofen e foram progressivamente mais acentuadas no grupo nitrofen com HDC que os fetos dos grupos CE e OO a partir do dia gestacional 17,5, fase pseudoglandular com pico máximo no dia gestacional 19,5. O mesmo ocorreu para os receptores de VEGFR-2 que apresentou maior imunomarcagem para os fetos expostos ao nitrofen com maiores valores para o grupo nitrofen com HDC que os fetos dos grupo CE e OO desde o dia gestacional 17,5, fase pseudoglandular até o dia 21,5 fase sacular do desenvolvimento pulmonar.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allan DW, Greer JJ. Pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in fetal rats. *J Appl Physiol.* 1997; 83 (2):338-47.

Alfonso LF, Arnaiz A, Alvarez FJ, Qi B, Diez-Pardo JA, Vallis-i-Soler A, Tovar JA. Lung hypoplasia and surfactant system immaturity induced in the fetal rat by prenatal exposure to nitrofen. *Biol Neonate.* 1996;69 (2):94-100.

Andersen DH. Incidence of congenital diaphragmatic in the young of rats bred on a diet deficient in vitamin A *Am J Dis Child.* 1941; 62:888-89.

Alon T, Hemo I, Itin A, Peter J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med.* 1995; 1 (10): 1024-28.

Areechon W, Reid Lynne. Hypoplasia of Lung with Congenital Diaphragmatic Hernia. *Br Med J.* 1963; 26 (1):230–33.

Babiuk RP, Thebaud B, Greer JJ. Reductions in the incidence of nitrofen-induced diaphragmatic hernia by vitamin A and retinoic acid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 286 (5):970–73.

Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem.* 1999; 274 (43):31047-54.

Chang R, Andreoli S, Ng YS, Truong T, Smith SR, Wilson J, D'Amore PA. VEGF expression is downregulated in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2004; 39 (6):825-28.

Cappon GD, Cook JC, Hurtt ME. Relationship between cyclooxygenase 1 and 2 selective inhibitors and fetal development when administered to rats and rabbits during the sensitive periods for heart development and midline closure. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2003; 68 (1):47–56.

Compernelle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, Veldhoven PV, Plate K, Moons L, Collem D, Carmeliet P. Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nature Medicine*. 2002; 8 (7): 702-10.

De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 1992; 255 (5047):989-91.

Fauza DO, Tannuri U, Ayoub AA, Capelozzi VL, Saldiva PH, Maksoud JG. Surgically produced congenital diaphragmatic hernia in fetal rabbits. *J Pediatr Surg*. 1994; 29 (7): 882-6.

Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997; 18 (1): 4-25.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995; 376 (6535):66-70.

Geggel RL, Murphy JD, Langleben D, Crone RK, Vacanti PJ, Reid LM. Congenital diaphragmatic hernia: arterial structural changes and persistent pulmonary hypertension after surgical repair. *J Pediatr*. 1985; 107 (3): 457-64.

Gosche JR, Islam S, Boulanger SC. Congenital diaphragmatic hernia: searching for answers. *Am J Surg*. Aug. 2005; 190 (2):324-32.

Gray LE Jr, Kavlock RJ, Chernoff N, Ferrell J, McLamb J, Ostby J. Prenatal exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenyl-pnitrophenyl ether destroys the rodent Harderian gland. *Science*. 1982; 215 (4530):293-94.

Greer JJ, Babiuk RP, Thebaud B. 2003. Etiology of congenital diaphragmatic hernia: The retinoid hypothesis. *Pediatr Res*. 2003; 53 (5):726-30.

Gupta U, Cook JC, Tassinari MS, Hurtt ME. Comparison of developmental toxicology of aspirin (acetylsalicylic acid) in rats using selected dosing paradigms. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2003; 68 (1):27-37.

- Hara A, Chapin CJ, Ertsey R, Kitterman JA. Changes in fetal lung distension alter expression of vascular endothelial growth factor and its isoforms in developing rat lung. *Pediatr Res*. 2005; 58 (1):30-7.
- Harding R, Thornburn GD. Development of the respiratory system. In: *Textbook of fetal Physiology*. New York: Oxford, 1994; 140-67.
- Harrison MR, Adzick NS, Estes JM, Howell LJ. A prospective study of the outcome for fetuses with diaphragmatic hernia. *JAMA*. 1994; 271 (5):382-84.
- Harrison MR, Bjordal RI, Langmark F, Knutrud O. Congenital diaphragmatic hernia: the hidden mortality. *J Pediatr Surg*. 1978; 13 (3):227-30.
- Hewett PW, Murray JC. Coexpression of flt-1, flt-4 and KDR in freshly isolated and cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 221(3):697-02.
- Hislop AA. Airway and blood vessel interaction during lung development. *J Anat Oct*. 2002R; 201(4):325-34.
- Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology*. 1^a.ed. New York: Springer-Verlag New York Inc. in association with BIOS Scientific Publishers Ltda, 1998.246p.
- Iritani I. Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia. *Anat Embryol*. 1984; 169: 133-9.
- Jakkula M, Le Cras TD, Gebb S, Hirth KP, Tuder RM, Voelkel NF, Abman SH. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279 (3):L600-7.
- Kearney JB, Ambler CA, Monaco KA, Johnson N, Rapoport RG, Bautch VL. Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division. *Blood*. 2002; 99 (7):2397-407.
- Kitagawa M, Hislop A, Boyden EA, Reid L. Lung hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia. A quantitative study of airway, artery, and alveolar development. *Br J Surg*. 1971; 58 (5):342-46.

Kitano Y, Kanai M, Davies P, von Allmen D, Yang EY, Radu A, Kitano Y, Adzick NS, Flake AW. BAPS prize-1999. Lung growth induced by prenatal tracheal occlusion and its modifying factors: a study in the rat model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2001; 36 (2):251-59.

Kling DE, Schnitzer JJ. Vitamin A deficiency (VAD), teratogenic, and surgical models of congenital diaphragmatic hernia (CDH). *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2007; 145C:139-57.

Kluth D, Kangah R, Reich P, Tenbrinck R, Tibboel D, Lambrecht W. Nitrofen-induced diaphragmatic hernias in rats: an animal model. *J Pediatr Surg.* 1990; 25 (8):850-54.

Kluth D, Tenbrinck R, von Ekesparre M, Kangah R, Reich P, Brandsma A, Tibboel D, Lambrecht W. The natural history of congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypoplasia in the embryo. *J Pediatr Surg.* 1993; 28 (3):456-63.

Lally KP. Congenital diaphragmatic hernia. *Curr Opin Pediatr.* 2002; 14 (4):486-90.

Langer JC. Congenital diaphragmatic hernia. *Chest Surg Clin N Am.* 1998; 8 (2):295-314.

Larrivee B, Karsan A. Signaling pathways induced by vascular endothelial growth factor (review). *Int J Mol Med.* 2002; 5 (5): 447-56.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara V. Vascular endothelial growth factor is secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989; 246 (4935): 1306-9.

Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE.* 2001; Dec 11 (112): RE21.

Mey J, Babiuk RP, Clugston R, Zhang W, Greer JJ. Retinal dehydrogenase-2 is inhibited by compounds that induce congenital diaphragmatic hernias in rodents. *Am J Pathol.* 2003; 162 (2):673-79.

Moore, Keith L, Dalley Arthur F. *Anatomia orientada para a clínica.* 5ª edição, 2007.

Moore e Persaud 2004, p219. Moore KL e Persaud TVN. *Embriologia Clínica.* 7ª. edição. Americana. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

Nakamura Y, Yamamoto I, Fukuda S, Hashimoto T. Pulmonary acinar development in diaphragmatic hernia. *Arch Pathol Lab Med.* 1991; 115 (4): 372-6.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *EMBO J.* 1999; 13 (1): 9-22.

Noble BR, Babiuk RP, Clugston R, Underhill TM, Sun H, Kawaguchi R, Walfish PG, Blomhoff R, Gundersen TE, Greer JJ. Mechanisms of action of the congenital diaphragmatic hernia-inducing teratogen nitrofen. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007; 293 (4): L1079-87.

Okazaki T, Sharma HS, Aikawa M, Yamataka A, Nagai R, Miyano T, Tibboel D. Pulmonary expression of vascular endothelial growth factor and myosin isoforms in rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1997; 32 (3):391-4.

Oue T, Yoneda A, Shima H, Taira Y, Puri P. Increased vascular endothelial growth factor peptide and gene expression in hypoplastic lung in nitrofen induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Pediatr Surg Int.* 2002; 18 (4):221-26.

Oue T, Shima H, Taira Y, Puri P. Administration of antenatal glucocorticoids upregulates peptide growth factor gene expression in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg.* 2000; 35 (1):109-12.

Papadakis K, De Paepe ME, Tackett LD, Piasecki GJ, Luks FI. Temporary tracheal occlusion causes catch-up lung maturation in a fetal model of diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1998; 3 (7):1030-7.

Pringle KC. Human fetal lung development and related animal models. *Clin Obst Gynecol.* 1986; 29 (3): 502-13.

Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90 (16):7533-37.

Roberts DM, Kearney JB, Johnson JH, Rosenberg MP, Kumar R, Bautch VL. The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. *Am J Pathol.* 2004; 164 (5):1531-35.

Ruano R, Bunduki V, Silva MM, Yoshizaki CT, Tanuri U, Macksoud JG, Zugaib M. Diagnóstico pré-natal e evolução perinatal de 38 casos de hérnia diafragmática congênita: 8 anos de experiência de um serviço terciário brasileiro. *Clinics, São Paulo*. 2006; 61 (3): 197-02.

Skari H, Bjornland K, Haugen G, egeland T, Emblem R. Congenital diaphragmatic hernia: a meta-analysis of mortality factors. *J Pediatr Surg*. 2000; 35 (8):1187-97.

Scheffers EC, IJsselstijn H, Tenbrinck R, Lachmann B, de Jongste JC, Molenaar JC, Tibboel D. Evaluation of lung function changes before and after surfactant application during artificial ventilation in newborn rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 1994; 29 (6):820-24.

Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970; 26 (1): 57-60.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995; 376 (6535):62-6.

Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J: A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell*. 1997; 89 (6):981-90.

Shehata SM, Mooi WJ, Okazaki T, El-Banna I, Sharma HS, Tibboel D. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in lungs of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypertension. *Thorax*. 1999; 54 (5):427-31.

Stege G, Fenton A, Jaffray B, Nihilism in the 1990s: the true mortality of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2003; 112 (3):532-

Sydorak RM, Harrison MR. Congenital diaphragmatic hernia: advances in prenatal therapy. *Clin Perinatol*. 2003; 30 (3):465-79.

Tenbrinck R, Tibboel D, Gaillard JL, Kluth D, Bos AP, Lachmann B, Molenaar JC. Experimentally induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg*. 1990; 25 (4):426-9.

Tenbrinck R, Gaillard JL, Tibboel D, Kluth D, Lachmann B, Molenaar JC. Pulmonary vascular abnormalities in experimentally induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg.* 1992; 27 (7):862-5.

Thébaud B, Tibboel D, Rambaud C, Mercier JC, Bourbon JR, Dinh-Xuan AT, Archer SL. Vitamin a decreases the incidence and severity of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1999; 277 (2Pt 1): 423-29.

Toi M, Matsumoto T, Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol.* 2001; 2(11): 667-73.

Torfs CP, Curry CJ, Bateson TF, Honore LH. A population-based study of congenital diaphragmatic hernia. *Teratology.* 1992; 46 (6):555–65.

Voelkel NF, Vandivier RW, Tuder RM. Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290 (2): L209–21.

Yamamoto Y, Shiraishi I, Dai P, Hamaoka K, Takamatsu T. Regulation of embryonic lung vascular development by vascular endothelial growth factor receptors, Flk-1 and Flt-1. *Anat Rec (Hoboken).* 2007; 290(8):958-73.

Yamataka T, Puri P. Pulmonary artery structural changes in pulmonary hypertension complicating congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1997; 32 (3):387-90.

Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1994; 269 (43):26988-95.

Warkany J, Roth CB. Congenital malformations induced in rats by maternal vitamin A deficiency. *J Nutr.* 1948; 35 (1):1-11.

Wilson JG, Roth CB, Warkany J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat.* 1953; 92 (2):189–217.

Wilting J, Eichmann A, Christ B. The avian VEGF receptor homologues Quek1 and Quek2 during quail embryonic development: Expression in blood-vascular and lymphatic endothelial and non-endothelial cells. *Cell Tissue Res.* 1997; 288 (2):207-23.

Wu J, Ge X, Verbeken EK, Gratacos E, Yesildagar N, Deprest JA. Pulmonary effects of in utero tracheal occlusion are dependent on gestational age in a rabbit model of diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2002; 37 (1):11-17.

Wu J, Yamamoto H, Gratacos E, Ge X, Verbeken E, Sueishi K, Hashimoto S, Vanamo K, Lerut T, Deprest J. Lung development following diaphragmatic hernia in the fetal rabbit. *Hum Reprod.* 2000; 15 (12):2483-88.

9- ANEXOS

Anexo 1- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μL) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μL) (VPE) dos fetos do grupo Controle Externo (CE) com 17,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
CE	17,5	1	1661	47	19	28	0,0283	52	15
CE	17,5	2	1514	46	17	29	0,0304	43	15
CE	17,5	3	1594	48	16	32	0,0301	45	14
CE	17,5	4	1517	35	13	22	0,0231	33	11
CE	17,5	5	1439	49	16	33	0,0341	47	16
CE	17,5	6	1621	52	17	35	0,0321	48	15
CE	17,5	7	1545	42	16	26	0,0272	41	14
CE	17,5	8	1606	47	15	32	0,0293	46	14
CE	17,5	9	1647	50	20	30	0,0304	48	19
CE	17,5	10	1630	58	20	38	0,0356	57	20
CE	17,5	11	1540	60	21	39	0,0390	58	20
CE	17,5	12	1519	57	19	38	0,0375	55	17
CE	17,5	13	1523	51	17	34	0,0335	49	16
CE	17,5	14	1535	40	13	27	0,0261	37	11
CE	17,5	15	1624	58	19	39	0,0357	57	19
CE	17,5	16	1664	51	18	33	0,0306	48	17
CE	17,5	17	1631	61	22	39	0,0374	59	20
CE	17,5	18	1624	61	20	41	0,0376	60	19
CE	17,5	19	1667	59	20	39	0,0354	57	19
CE	17,5	20	1473	50	15	35	0,0339	48	14
		M	1578,7	51,1	17,65	33,45	0,0324	49,4	16
		DP	68,30	7,29	2,56	5,24	0,0043	7,50	2,84

Anexo 2- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μ L) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μ L) (VPE) dos fetos do grupo Controle Externo (CE) com 18,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
CE	18,5	1	2396	64	21	43	0,0267	61	20
CE	18,5	2	2074	66	24	42	0,0318	64	23
CE	18,5	3	2248	62	26	36	0,0276	61	25
CE	18,5	4	2198	72	25	47	0,0328	70	25
CE	18,5	5	2109	50	19	31	0,0237	50	18
CE	18,5	6	2135	56	20	36	0,0262	56	19
CE	18,5	7	2480	86	29	57	0,0347	82	28
CE	18,5	8	2499	80	36	44	0,0320	76	34
CE	18,5	9	2655	97	33	64	0,0365	93	31
CE	18,5	10	2573	103	36	67	0,0400	101	34
CE	18,5	11	2591	70	22	48	0,0270	68	20
CE	18,5	12	2464	100	34	66	0,0406	95	30
CE	18,5	13	2344	76	30	46	0,0324	74	30
CE	18,5	14	2335	106	36	70	0,0454	102	35
CE	18,5	15	2575	96	36	60	0,0373	93	34
CE	18,5	16	2514	92	31	61	0,0366	89	30
CE	18,5	17	2507	98	34	64	0,0391	95	31
CE	18,5	18	2368	83	30	53	0,0351	78	27
CE	18,5	19	2076	60	19	41	0,0289	57	18
CE	18,5	20	2222	89	33	56	0,0401	86	32
		M	2368	80	29	52	0,0337	78	27
		DP	185,91	17,13	6,18	11,73	0,0058	16,22	5,82

Anexo 3- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μ L) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μ L) (VPE) dos fetos do grupo Contole Externo (CE) com 19,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
CE	19,5	1	4070	119	43	76	0,0292	117	42
CE	19,5	2	3598	129	46	83	0,0359	126	45
CE	19,5	3	3392	127	42	85	0,0374	124	41
CE	19,5	4	3705	133	48	85	0,0359	130	46
CE	19,5	5	3316	121	48	73	0,0365	118	42
CE	19,5	6	2878	98	37	61	0,0341	96	35
CE	19,5	7	3965	140	49	91	0,0353	137	48
CE	19,5	8	4516	132	47	85	0,0292	128	46
CE	19,5	9	4089	136	48	88	0,0333	131	45
CE	19,5	10	4268	124	38	86	0,0291	121	36
CE	19,5	11	4257	133	46	87	0,0312	134	46
CE	19,5	12	4074	141	48	93	0,0346	137	43
CE	19,5	13	3778	135	44	91	0,0357	133	43
CE	19,5	14	3526	114	40	74	0,0323	109	36
CE	19,5	15	4275	129	47	82	0,0302	127	46
CE	19,5	16	4125	127	44	83	0,0308	125	43
CE	19,5	17	4200	135	47	88	0,0321	131	45
CE	19,5	18	3992	120	45	75	0,0301	115	43
CE	19,5	19	4177	124	34	90	0,0297	121	33
CE	19,5	20	3982	106	26	80	0,0266	102	25
		M	3909	126	43	83	0,0325	123	41
		DP	400,04	10,96	5,83	7,78	0,0031	11,11	5,70

Anexo 4- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μ L) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μ L) (VPE) dos fetos do grupo Contole Externo (CE) com 20,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
CE	20,5	1	5641	116	40	76	0,0206	112	38
CE	20,5	2	5990	121	41	80	0,0202	119	40
CE	20,5	3	5731	115	40	75	0,0201	111	36
CE	20,5	4	6066	111	39	72	0,0183	109	37
CE	20,5	5	6255	116	40	76	0,0185	110	37
CE	20,5	6	5443	95	35	60	0,0175	91	34
CE	20,5	7	6026	102	37	65	0,0169	92	32
CE	20,5	8	5592	117	39	78	0,0209	107	30
CE	20,5	9	5672	184	65	119	0,0324	168	52
CE	20,5	10	5021	143	53	90	0,0285	142	53
CE	20,5	11	5563	170	52	118	0,0306	167	50
CE	20,5	12	4996	172	58	114	0,0344	170	57
CE	20,5	13	5289	162	55	107	0,0306	158	53
CE	20,5	14	5414	171	60	111	0,0316	181	72
CE	20,5	15	4796	158	57	101	0,0329	152	54
CE	20,5	16	5716	202	68	134	0,0353	198	68
CE	20,5	17	5386	167	64	103	0,0310	165	62
CE	20,5	18	5800	186	64	122	0,0321	182	62
CE	20,5	19	5810	191	65	126	0,0329	188	64
CE	20,5	20	4884	157	55	102	0,0321	152	52
		M	5554,6	147,8	51,35	96,45	0,0269	143,7	49,15
		DP	405,38	33,23	11,29	22,36	0,0067	34,19	12,83

Anexo 5- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μ L) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μ L) (VPE) dos fetos do grupo Controle Externo (CE) com 21,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
CE	21,5	1	7069	153	49	104	0,0216	153	47
CE	21,5	2	7295	128	45	83	0,0175	129	42
CE	21,5	3	6763	125	45	80	0,0185	129	45
CE	21,5	4	7117	135	44	91	0,0190	131	42
CE	21,5	5	6152	148	47	101	0,0241	144	46
CE	21,5	6	6512	149	48	101	0,0229	146	47
CE	21,5	7	6719	156	57	99	0,0232	153	55
CE	21,5	8	6204	175	57	118	0,0282	174	56
CE	21,5	9	5735	156	53	103	0,0272	155	53
CE	21,5	10	5764	152	56	96	0,0264	149	54
CE	21,5	11	6445	155	51	104	0,0240	155	51
CE	21,5	12	6267	160	54	106	0,0255	159	53
CE	21,5	13	6247	143	48	95	0,0229	137	43
CE	21,5	14	6893	150	51	99	0,0218	147	49
CE	21,5	15	6823	133	45	88	0,0195	131	44
CE	21,5	16	6088	109	37	72	0,0179	111	39
CE	21,5	17	6140	141	46	95	0,0230	137	45
CE	21,5	18	5622	112	40	72	0,0199	110	39
CE	21,5	19	6798	165	53	112	0,0243	163	52
CE	21,5	20	6643	154	65	89	0,0232	152	64
		M	6465	145	50	95	0,0225	143	48
		DP	477,06	16,93	6,51	12,13	0,0031	16,40	6,40

Anexo 6- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μ L) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μ L) (VPE) dos fetos do grupo Óleo de Oliva (OO) com 17,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
OO	17,5	1	1322	51	17	34	0,0386	47	15
OO	17,5	2	1409	54	15	39	0,0383	53	14
OO	17,5	3	1316	58	15	43	0,0441	55	13
OO	17,5	4	1463	57	16	41	0,0390	55	16
OO	17,5	5	1232	42	13	29	0,0341	40	12
OO	17,5	6	1460	45	13	32	0,0308	44	12
OO	17,5	7	1306	39	12	27	0,0299	37	10
OO	17,5	8	1435	43	14	29	0,0300	40	12
OO	17,5	9	1427	35	15	20	0,0245	41	13
OO	17,5	10	1388	30	13	17	0,0216	28	10
OO	17,5	11	1340	37	13	24	0,0276	38	13
OO	17,5	12	1335	49	18	31	0,0367	46	17
OO	17,5	13	1237	39	13	26	0,0315	37	12
OO	17,5	14	1384	45	17	28	0,0325	41	15
OO	17,5	15	1333	48	16	32	0,0360	45	13
OO	17,5	16	1358	51	16	35	0,0376	48	15
OO	17,5	17	1412	44	15	29	0,0312	42	14
OO	17,5	18	1367	38	16	22	0,0278	36	14
OO	17,5	19	1303	43	13	30	0,0330	39	10
OO	17,5	20	1320	48	15	33	0,0364	45	13
		M	1357,4	44,8	14,75	30,05	0,0331	42,85	13
		DP	65,50	7,35	1,68	6,61	0,0054	6,73	1,93

Anexo 7- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μ L) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μ L) (VPE) dos fetos do grupo Óleo de Oliva (OO) com 18,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
OO	18,5	1	2466	94	25	69	0,0381	91	24,0
OO	18,5	2	2594	87	30	57	0,0335	84	28,0
OO	18,5	3	2328	76	26	50	0,0326	73	24,0
OO	18,5	4	2375	86	29	57	0,0362	81	28,0
OO	18,5	5	2324	85	28	57	0,0366	81	27,0
OO	18,5	6	2529	73	27	46	0,0289	69	26,0
OO	18,5	7	2362	81	29	52	0,0343	77	28,0
OO	18,5	8	2541	89	29	60	0,0350	87	28,0
OO	18,5	9	2643	102	31	71	0,0386	100	30,0
OO	18,5	10	2441	104	32	72	0,0426	102	30,0
OO	18,5	11	2454	105	36	69	0,0428	101	35,0
OO	18,5	12	2182	79	28	51	0,0362	76	26,0
OO	18,5	13	2396	87	26	61	0,0363	85	25,0
OO	18,5	14	2400	94	25	69	0,0392	91	24,0
OO	18,5	15	2403	95	29	66	0,0395	92	28,0
OO	18,5	16	2701	91	32	59	0,0337	88	30,0
OO	18,5	17	2284	88	28	60	0,0385	85	27,0
OO	18,5	18	2611	104	33	71	0,0398	102	32,0
OO	18,5	19	2263	86	32	54	0,0380	83	30,0
OO	18,5	20	2463	83	29	54	0,0337	80	24,0
		M	2438	89	29	60	0,0367	86	28
		DP	134,79	9,26	2,84	7,97	0,0034	9,63	2,92

Anexo 8- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μ L) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μ L) (VPE) dos fetos do grupo Óleo de Oliva (OO) com 19,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
OO	19,5	1	3608	131	42	89	0,0363	130	40
OO	19,5	2	3554	126	42	84	0,0355	123	41
OO	19,5	3	3746	115	41	74	0,0307	112	39
OO	19,5	4	3666	123	42	81	0,0336	120	40
OO	19,5	5	2939	91	30	61	0,0310	85	26
OO	19,5	6	3438	103	39	64	0,0300	101	27
OO	19,5	7	3827	157	53	104	0,0410	153	51
OO	19,5	8	3540	143	48	95	0,0404	139	47
OO	19,5	9	3712	160	52	108	0,0431	154	48
OO	19,5	10	3418	124	39	85	0,0363	121	37
OO	19,5	11	3478	132	44	88	0,0380	128	42
OO	19,5	12	3861	134	48	86	0,0347	132	47
OO	19,5	13	3729	132	45	87	0,0354	127	42
OO	19,5	14	3896	130	46	84	0,0334	130	46
OO	19,5	15	3916	130	45	85	0,0332	126	4
OO	19,5	16	4069	138	48	90	0,0339	133	46
OO	19,5	17	3943	143	51	92	0,0363	140	49
OO	19,5	18	3757	144	46	98	0,0383	139	42
OO	19,5	19	3959	140	47	93	0,0354	137	46
OO	19,5	20	2792	103	34	69	0,0369	100	32
		M	3642	130	44	86	0,0357	127	40
		DP	323,39	17,25	5,75	11,97	0,0034	17,06	10,80

Anexo 9- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μL) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μL) (VPE) dos fetos do grupo Óleo de Oliva (OO) com 20,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
OO	20,5	1	5998	140	48	92	0,0233	138	47
OO	20,5	2	5580	146	49	97	0,0262	140	46
OO	20,5	3	5451	149	67	82	0,0273	146	66
OO	20,5	4	5271	136	48	88	0,0258	131	45
OO	20,5	5	4667	157	53	104	0,0336	150	50
OO	20,5	6	5288	154	53	101	0,0291	150	50
OO	20,5	7	5169	163	50	113	0,0315	162	49
OO	20,5	8	4771	151	46	105	0,0316	147	44
OO	20,5	9	5087	132	42	90	0,0259	130	41
OO	20,5	10	4941	132	42	90	0,0267	130	41
OO	20,5	11	5231	154	51	103	0,0294	150	48
OO	20,5	12	4609	138	50	88	0,0299	138	49
OO	20,5	13	4941	135	51	84	0,0273	132	48
OO	20,5	14	4383	128	45	83	0,0292	126	43
OO	20,5	15	4592	121	43	78	0,0264	119	42
OO	20,5	16	5468	125	42	83	0,0229	122	40
OO	20,5	17	4965	166	53	113	0,0334	163	53
OO	20,5	18	5264	142	46	96	0,0270	140	46
OO	20,5	19	4213	110	38	72	0,0261	107	35
OO	20,5	20	4778	123	44	79	0,0257	120	41
			5033,		48,0				
		M	4	140,1	5	92,05	0,0279	137,05	46,2
			434,5						
		DP	8	14,90	6,19	11,63	0,0030	14,56	6,36

Anexo 10- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μ L) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μ L) (VPE) dos fetos do grupo Óleo de Oliva (OO) com 21,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
OO	21,5	1	6179	138	49	89	0,0223	135	47
OO	21,5	2	6527	167	61	106	0,0256	161	58
OO	21,5	3	5858	135	48	87	0,0230	130	46
OO	21,5	4	6037	143	46	97	0,0237	140	44
OO	21,5	5	5464	134	48	86	0,0245	130	46
OO	21,5	6	6315	147	50	97	0,0233	143	48
OO	21,5	7	5715	130	41	89	0,0227	127	39
OO	21,5	8	5516	118	41	77	0,0214	115	40
OO	21,5	9	5921	143	47	96	0,0242	133	41
OO	21,5	10	5745	146	47	99	0,0254	143	46
OO	21,5	11	5822	156	51	105	0,0268	154	50
OO	21,5	12	5554	144	49	95	0,0259	140	44
OO	21,5	13	5781	151	52	99	0,0261	148	50
OO	21,5	14	5565	149	45	104	0,0268	146	45
OO	21,5	15	5839	128	50	78	0,0219	125	48
OO	21,5	16	5687	167	58	109	0,0294	160	52
OO	21,5	17	5415	149	53	96	0,0275	145	51
OO	21,5	18	5755	145	45	100	0,0252	139	43
OO	21,5	19	5438	159	55	104	0,0292	150	52
OO	21,5	20	5807	137	45	92	0,0236	131	43
		M	5797	144	49	95	0,0249	140	47
		DP	292,67	12,43	5,06	8,84	0,0023	11,82	4,65

Anexo 11- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μL) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μL) (VPE) dos fetos do grupo Nitrofen sem HDC com 17,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
NITR	17,5	1	1442	32	9	23	0,0222	28	7
NITR	17,5	2	1445	27	10	17	0,0187	27	8
NITR	17,5	3	1150	30	10	20	0,0261	26	7
NITR	17,5	4	1168	26	10	16	0,0223	23	8
NITR	17,5	5	1069	23	8	15	0,0215	20	7
NITR	17,5	6	1223	36	11	25	0,0294	30	7
NITR	17,5	7	1267	40	10	30	0,0316	33	5
NITR	17,5	8	1115	30	8	22	0,0269	23	3
NITR	17,5	9	1052	28	10	18	0,0266	27	10
NITR	17,5	10	1082	27	10	17	0,0250	20	4
NITR	17,5	11	137	35	11	24	0,2555	32	10
NITR	17,5	12	1443	32	10	22	0,0222	28	8
NITR	17,5	13	1385	38	13	25	0,0274	35	12
NITR	17,5	14	1452	32	7	25	0,0220	27	4
NITR	17,5	15	1435	33	12	21	0,0230	29	10
NITR	17,5	16	1559	32	12	20	0,0205	26	10
NITR	17,5	17	1414	34	11	23	0,0240	33	12
NITR	17,5	18	1380	36	10	26	0,0261	29	6
NITR	17,5	19	1354	30	10	20	0,0222	25	8
NITR	17,5	20	1422	35	11	24	0,0246	29	7
		M	1249,7	31,8	10,15	21,65	0,0359	27,5	7,65
		DP	304,35	4,29	1,42	3,83	0,0518	4,07	2,52

Anexo 12- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μL) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μL) (VPE) dos fetos do grupo Nitrofen sem HDC com 18,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
NITR	18,5	1	2337	68	25	43	0,0291	63	23
NITR	18,5	2	1935	49	17	32	0,0253	46	15
NITR	18,5	3	1975	57	19	38	0,0289	54	18
NITR	18,5	4	1976	51	17	34	0,0258	48	15
NITR	18,5	5	1881	53	23	30	0,0282	50	20
NITR	18,5	6	2009	62	28	34	0,0309	60	28
NITR	18,5	7	2266	48	19	29	0,0212	45	17
NITR	18,5	8	1891	58	20	38	0,0307	56	19
NITR	18,5	9	2012	64	22	42	0,0318	62	21
NITR	18,5	10	1915	60	21	39	0,0313	57	20
NITR	18,5	11	2145	54	19	35	0,0252	52	19
NITR	18,5	12	2335	78	27	51	0,0334	72	24
NITR	18,5	13	2349	83	31	52	0,0353	79	29
NITR	18,5	14	2049	62	20	42	0,0303	57	16
NITR	18,5	15	2164	63	23	40	0,0291	59	20
NITR	18,5	16	2295	84	29	55	0,0366	76	24
NITR	18,5	17	2184	79	29	50	0,0362	73	25
NITR	18,5	18	2133	67	23	44	0,0314	60	21
NITR	18,5	19	2374	64	26	38	0,0270	60	23
NITR	18,5	20	2031	56	22	34	0,0276	54	21
		M	2113	63	23	40	0,0298	59	21
		DP	167,41	10,84	4,19	7,45	0,0039	9,64	3,89

Anexo 13- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μ L) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μ L) (VPE) dos fetos do grupo Nitrofen sem HDC com 19,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
NITR	19,5	1	2940	82	29	53	0,0279	75	25
NITR	19,5	2	3377	110	41	69	0,0326	107	40
NITR	19,5	3	3274	99	36	63	0,0302	96	34
NITR	19,5	4	3489	118	43	75	0,0338	113	40
NITR	19,5	5	3462	117	45	72	0,0338	113	43
NITR	19,5	6	3337	117	41	76	0,0351	113	40
NITR	19,5	7	3665	123	44	79	0,0336	120	42
NITR	19,5	8	3150	81	28	53	0,0257	78	25
NITR	19,5	9	3736	104	40	64	0,0278	98	38
NITR	19,5	10	3706	97	34	63	0,0262	92	31
NITR	19,5	11	3330	89	31	58	0,0267	86	29
NITR	19,5	12	3224	85	41	44	0,0264	82	39
NITR	19,5	13	3507	112	38	74	0,0319	111	37
NITR	19,5	14	3513	89	34	55	0,0253	87	32
NITR	19,5	15	3497	96	35	61	0,0275	95	34
NITR	19,5	16	3464	128	42	86	0,0370	123	40
NITR	19,5	17	3512	130	45	72	0,0313	126	43
NITR	19,5	18	3655	110	38	68	0,0298	108	43
NITR	19,5	19	3385	109	41	59	0,0278	106	29
NITR	19,5	20	3147	94	35	59	0,0299	98	39
		M	3419	105	38	65	0,0300	101	36
		DP	204,11	15,16	5,12	10,35	0,0035	14,97	5,89

Anexo 14- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μ L) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μ L) (VPE) dos fetos do grupo Nitrofen sem HDC com 20,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
NITR	20,5	1	4574	104	40	64	0,0227	102	40
NITR	20,5	2	4747	121	40	81	0,0255	118	39
NITR	20,5	3	4051	113	40	73	0,0279	110	39
NITR	20,5	4	4979	110	40	70	0,0221	107	38
NITR	20,5	5	5171	101	39	62	0,0195	100	38
NITR	20,5	6	4304	107	35	72	0,0249	102	34
NITR	20,5	7	5023	114	40	74	0,0227	112	39
NITR	20,5	8	4664	97	40	57	0,0208	95	39
NITR	20,5	9	4461	111	39	72	0,0249	107	36
NITR	20,5	10	4269	102	40	62	0,0239	98	36
NITR	20,5	11	4249	94	33	61	0,0221	92	36
NITR	20,5	12	4483	106	44	62	0,0236	99	40
NITR	20,5	13	4276	75	30	45	0,0175	72	28
NITR	20,5	14	4299	95	33	62	0,0221	89	29
NITR	20,5	15	4075	72	23	49	0,0177	65	21
NITR	20,5	16	4464	88	30	58	0,0197	84	28
NITR	20,5	17	4275	117	43	74	0,0274	113	41
NITR	20,5	18	5320	142	55	87	0,0267	139	51
NITR	20,5	19	4497	107	40	67	0,0238	100	38
NITR	20,5	20	5270	118	46	72	0,0224	109	43
		M	4573	104,7	38,5	66,2	0,0229	100,7	36,65
		DP	389,87	15,80	6,71	10,09	0,0029	16,09	6,39

Anexo 15- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μL) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μL) (VPE) dos fetos do grupo Nitrofen sem HDC com 21,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
NITR	21,5	1	5096	96	34	62	0,0188	93	32
NITR	21,5	2	5506	111	42	69	0,0202	106	40
NITR	21,5	3	6240	113	44	69	0,0181	110	43
NITR	21,5	4	5926	96	37	59	0,0162	90	34
NITR	21,5	5	5779	89	29	60	0,0154	84	25
NITR	21,5	6	5855	112	46	66	0,0191	107	44
NITR	21,5	7	5819	107	44	63	0,0184	103	42
NITR	21,5	8	6250	130	44	86	0,0208	126	42
NITR	21,5	9	5834	118	45	73	0,0202	115	44
NITR	21,5	10	6217	110	38	72	0,0177	103	35
NITR	21,5	11	6146	123	43	80	0,0200	119	41
NITR	21,5	12	6606	126	43	83	0,0191	123	41
NITR	21,5	13	5506	85	37	48	0,0154	81	35
NITR	21,5	14	4558	53	23	30	0,0116	51	29
NITR	21,5	15	5206	109	39	70	0,0209	105	31
NITR	21,5	16	5213	68	35	33	0,0130	65	34
NITR	21,5	17	5455	103	37	66	0,0189	99	36
NITR	21,5	18	4626	87	30	57	0,0188	83	29
NITR	21,5	19	5332	101	36	65	0,0189	96	33
NITR	21,5	20	5070	91	32	59	0,0179	90	33
		M	5612	101	38	63,5	0,0180	97	36
		DP	553,03	19,09	6,18	14,20	0,0025	18,76	5,63

Anexo 16- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μL) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μL) (VPE) dos fetos do grupo Nitrofen com HDC com 17,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
CDH	17,5	1	1360	32	10	22	0,0235	30	9
CDH	17,5	2	1469	25	9	16	0,0170	20	7
CDH	17,5	3	1403	32	7	25	0,0228	30	7
CDH	17,5	4	1661	30	12	18	0,0181	23	10
CDH	17,5	5	1353	16	6	10	0,0118	26	10
CDH	17,5	6	1476	36	12	24	0,0244	32	10
CDH	17,5	7	1461	26	8	18	0,0178	24	8
CDH	17,5	8	1491	36	12	24	0,0241	34	11
CDH	17,5	9	1413	40	14	26	0,0283	37	13
CDH	17,5	10	1256	24	8	16	0,0191	22	7
CDH	17,5	11	1470	37	14	23	0,0252	36	14
CDH	17,5	12	1398	25	12	13	0,0179	21	10
CDH	17,5	13	1388	34	13	21	0,0245	30	20
CDH	17,5	14	1366	28	5	23	0,0205	23	4
CDH	17,5	15	1238	22	8	14	0,0178	18	7
CDH	17,5	16	1265	26	8	18	0,0206	23	7
CDH	17,5	17	1209	29	8	21	0,0240	24	7
CDH	17,5	18	1441	33	11	22	0,0229	30	10
CDH	17,5	19	1379	25	8	17	0,0181	17	7
CDH	17,5	20	1424	33	11	22	0,0232	28	7
		M	1396,05	29,45	9,8	19,65	0,0211	26,4	9,25
		DP	103,85	5,92	2,65	4,36	0,0039	5,82	3,46

Anexo 17- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μ L) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μ L) (VPE) dos fetos do grupo Nitrofen com HDC com 18,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
CDH	18,5	1	2087	52	12	40	0,0249	50	11
CDH	18,5	2	2031	47	19	28	0,0231	43	18
CDH	18,5	3	2002	48	18	30	0,0240	45	18
CDH	18,5	4	1897	50	21	29	0,0264	48	20
CDH	18,5	5	2487	61	19	42	0,0245	58	18
CDH	18,5	6	2637	56	17	39	0,0212	55	18
CDH	18,5	7	2387	64	24	40	0,0268	60	22
CDH	18,5	8	1938	61	17	44	0,0315	58	16
CDH	18,5	9	2052	70	24	46	0,0341	67	23
CDH	18,5	10	2003	56	20	36	0,0280	54	19
CDH	18,5	11	1960	60	19	41	0,0306	58	18
CDH	18,5	12	1980	76	24	52	0,0384	74	23
CDH	18,5	13	2201	69	22	47	0,0313	67	20
CDH	18,5	14	1964	63	22	41	0,0321	53	16
CDH	18,5	15	2108	59	21	38	0,0280	56	20
CDH	18,5	16	2307	47	17	30	0,0204	44	15
CDH	18,5	17	2185	69	25	44	0,0316	66	23
CDH	18,5	18	2131	62	23	39	0,0291	60	22
CDH	18,5	19	2271	52	15	37	0,0229	50	14
CDH	18,5	20	1956	53	21	32	0,0271	50	18
		M	2129	59	20	39	0,0278	56	19
		DP	200,12	8,30	3,37	6,47	0,0046	8,36	3,20

Anexo 18- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μL) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μL) (VPE) dos fetos do grupo Nitrofen com HDC com 19,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
CDH	19,5	1	3016	90	29	61	0,0298	88	29
CDH	19,5	2	2891	68	24	44	0,0235	65	23
CDH	19,5	3	3190	78	22	56	0,0245	75	22
CDH	19,5	4	2993	61	21	40	0,0204	59	20
CDH	19,5	5	2926	62	21	41	0,0212	59	20
CDH	19,5	6	3040	62	21	41	0,0204	60	20
CDH	19,5	7	3268	77	26	51	0,0236	75	25
CDH	19,5	8	2793	67	20	47	0,0240	63	18
CDH	19,5	9	2889	71	24	47	0,0246	67	22
CDH	19,5	10	3451	94	30	64	0,0305	91	27
CDH	19,5	11	3423	117	45	72	0,0339	113	44
CDH	19,5	12	3446	85	24	61	0,0248	82	23
CDH	19,5	13	3279	73	23	50	0,0223	71	22
CDH	19,5	14	3668	106	39	67	0,0289	103	38
CDH	19,5	15	2793	67	20	47	0,0240	64	18
CDH	19,5	16	2889	71	24	47	0,0246	67	22
CDH	19,5	17	3164	81	26	55	0,0256	78	23
CDH	19,5	18	2922	68	19	49	0,0233	63	17
CDH	19,5	19	2844	72	24	48	0,0253	68	19
CDH	19,5	20	3082	71	27	44	0,0230	67	25
		M	3098	77	25	48	0,0243	74	24
		DP	252,71	14,86	6,45	3,67	0,0011	14,85	6,67

Anexo 19- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μL) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μL) (VPE) dos fetos do grupo Nitrofen com HDC com 20,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
CDH	20,5	1	5160	89	29	60	0,0172	86	28
CDH	20,5	2	4238	92	23	69	0,0217	86	19
CDH	20,5	3	4686	76	22	54	0,0162	72	19
CDH	20,5	4	4919	99	28	71	0,0201	96	27
CDH	20,5	5	4475	103	40	63	0,0230	101	38
CDH	20,5	6	4995	75	21	54	0,0150	74	20
CDH	20,5	7	4091	75	20	55	0,0183	68	14
CDH	20,5	8	4258	64	25	39	0,0150	62	25
CDH	20,5	9	4405	76	23	53	0,0173	73	21
CDH	20,5	10	4240	82	25	57	0,0193	75	25
CDH	20,5	11	4328	80	34	46	0,0185	79	33
CDH	20,5	12	4953	99	33	66	0,0200	93	32
CDH	20,5	13	3873	62	23	39	0,0160	57	19
CDH	20,5	14	4335	80	25	55	0,0185	78	25
CDH	20,5	15	4470	81	23	58	0,0181	76	20
CDH	20,5	16	3974	65	24	41	0,0164	60	21
CDH	20,5	17	4791	84	30	54	0,0175	79	23
CDH	20,5	18	4423	78	24	54	0,0176	75	23
CDH	20,5	19	4912	69	24	45	0,0140	63	21
CDH	20,5	20	4590	75	22	53	0,0163	70	19
		M	4505,8	80,2	25,9	54,3	0,0178	76,15	23,6
		DP	360,05	11,55	5,04	9,08	0,0023	11,81	5,74

Anexo 20- Resultados das medidas do peso corporal (mg) (PC), peso pulmonar total (mg) (PPT), peso pulmonar esquerdo (mg) (PPE), peso do pulmão direito (mg) (PPD), relação peso pulmonar total e peso corporal (PP/PC), volume pulmonar total (μ L) (VPT) e volume pulmonar esquerdo (μ L) (VPE) dos fetos do grupo Nitrofen com HDC com 21,5 dias de gestação (DG).

Grupo	Dia	Número	PC	PPT	PPE	PPD	PP/PC	VPT	VPE
CDH	21,5	1	6087	86	29	57	0,0141	82	26
CDH	21,5	2	6090	71	24	47	0,0117	70	23
CDH	21,5	3	6261	97	39	58	0,0155	88	37
CDH	21,5	4	6026	75	21	54	0,0124	74	21
CDH	21,5	5	5537	80	25	55	0,0144	76	21
CDH	21,5	6	6181	79	23	56	0,0128	79	23
CDH	21,5	7	5123	67	19	48	0,0131	65	17
CDH	21,5	8	4896	71	24	47	0,0145	69	23
CDH	21,5	9	5236	68	22	46	0,0130	64	21
CDH	21,5	10	5635	90	28	62	0,0160	86	25
CDH	21,5	11	5127	80	25	55	0,0156	77	23
CDH	21,5	12	4873	61	24	37	0,0125	59	23
CDH	21,5	13	4578	68	21	47	0,0149	66	20
CDH	21,5	14	4645	69	21	48	0,0149	77	20
CDH	21,5	15	5649	117	39	78	0,0207	120	36
CDH	21,5	16	5019	87	29	58	0,0173	82	25
CDH	21,5	17	5542	79	22	57	0,0143	76	20
CDH	21,5	18	5259	85	22	63	0,0162	81	19
CDH	21,5	19	5277	52	17	35	0,0099	50	15
CDH	21,5	20	5300	77	26	51	0,0145	74	25
		M	5417	78	25	53	0,0144	76	23
		DP	512,34	13,96	5,69	9,45	0,0023	13,97	5,33

Anexo 21- Resultados da porcentagem de contagem de parênquima pulmonar (Par) e dos espaços aéreos (EA) dos pulmões esquerdo do grupo CE nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5.

CE Nº	17,5		18,5		19,5		20,5		21,5	
	Par	EA	Par	EA	Par	EA	Par	EA	Par	EA
1	77	23	74	26	78	22	78	22	54	46
2	75	25	77	23	75	25	75	25	44	56
3	83	17	78	22	78	22	78	22	43	57
4	77	23	81	19	72	28	72	28	41	59
5	75	25	82	18	69	31	69	31	47	53
6	84	16	71	29	68	32	68	32	53	47
7	78	22	76	24	70	30	70	30	30	70
8	67	33	75	25	73	27	73	27	48	52
9	79	21	75	25	75	25	75	25	40	60
10	86	14	68	32	68	32	68	32	44	56
11	72	28	75	25	74	26	74	26	36	64
12	74	26	75	25	67	33	67	33	37	63
13	77	23	76	24	62	38	62	38	39	61
14	78	22	74	26	63	37	63	37	43	57
15	81	19	77	23	74	26	74	26	43	57
16	81	19	83	17	69	31	69	31	37	63
17	80	20	73	27	73	27	73	27	47	53
18	84	16	79	21	61	39	61	39	50	50
19	88	12	78	22	63	37	63	37	35	65
20	93	7	78	22	65	35	65	35	26	74
21	88	12	66	34	62	38	62	38	63	37
22	88	12	72	28	60	40	60	40	60	40
23	85	15	77	23	65	35	65	35	52	48
24	84	16	85	15	63	37	63	37	63	37
25	83	17	87	13	56	44	56	44	47	53
26	86	14	79	21	61	39	61	39	50	50
27	87	13	81	19	60	40	60	40	64	36
28	78	22	80	20	59	41	59	41	50	50
29	85	15	83	17	52	48	52	48	64	36
30	89	11	82	18	68	32	68	32	68	32
31	80	20	84	16	55	45	55	45	72	28
32	82	18	77	23	56	44	56	44	57	43
33	83	17	76	24	62	38	62	38	56	44
34	87	13	79	21	64	36	64	36	53	47
35	89	11	83	17	57	43	57	43	44	56
36	87	13	77	23	72	28	72	28	58	42
37	83	17	78	22	58	42	58	42	49	51
38	85	15	78	22	64	36	64	36	44	56
39	83	17	73	27	61	39	61	39	52	48
40	86	14	70	30	64	36	64	36	55	45

41	92	8	74	26	68	32	68	32	48	52
42	90	10	71	29	74	26	74	26		
43	92	8	75	25	70	30	70	30		
44	91	9	63	37	69	31	69	31		
45	85	15	78	22	71	29	71	29		
46	89	11	78	22	64	36	64	36		
47	88	12	72	28	74	26	74	26		
48	93	7	84	16						
49	87	13								
M	83,55	16,45	76,81	23,19	66,09	33,91	63,92	36,08	48,93	51,07
DP	5,76	5,76	4,90	4,90	6,47	6,47	5,87	5,87	10,21	10,21

Anexo 22- Resultados da porcentagem de contagem de parênquima pulmonar (Par) e dos espaços aéreos (EA) dos pulmões esquerdo do grupo OO nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5.

OO Nº	17,5		18,5		19,5		20,5		21,5	
	Par	EA	Par	EA	Par	EA	Par	EA	Par	EA
1	90	10	85	15	68	32	67	33	55	45
2	94	6	85	15	71	29	68	32	56	44
3	92	8	83	17	77	23	55	45	67	33
4	95	5	94	6	72	28	59	41	58	42
5	91	9	87	13	82	18	64	36	61	39
6	89	11	95	5	84	16	55	45	68	32
7	91	9	88	12	80	20	64	36	62	38
8	88	12	93	7	76	24	66	34	61	39
9	87	13	92	8	77	23	75	25	68	32
10	85	15	91	9	78	22	57	43	64	36
11	88	12	84	16	75	25	55	45	57	43
12	86	14	87	13	78	22	65	35	58	42
13	85	15	97	3	73	27	68	32	56	44
14	89	11	87	13	73	27	65	35	60	40
15	86	14	85	15	70	30	61	39	64	36
16	81	19	94	6	69	31	55	45	54	46
17	83	17	90	10	82	18	60	40	66	34
18	93	7	96	4	65	35	66	34	53	47
19	95	5	94	6	77	23	74	26	71	29
20	90	10	88	12	65	35	63	37	58	42
21	88	12	93	7	75	25	56	44	61	39
22	86	14	85	15	78	22	58	42	53	47
23	90	10	79	21	79	21	73	27	55	45
24	87	13	93	7	78	22	71	29	54	46
25	85	15	87	13	76	24	63	37	54	46
26	88	12	70	30	78	22	59	41	52	48
27	92	8	96	4	65	35	63	37	46	54
28	86	14	93	7	77	23	55	45	67	33
29	94	6	80	20	73	27	57	43	49	51
30	85	15	81	19	73	27	64	36	49	51
31	85	15	88	12	80	20	68	32	60	40
32	83	17	75	25	70	30	65	35	47	53
33	85	15	88	12	79	21	58	42	51	49
34	93	7	73	27	75	25	71	29	56	44
35	91	9	93	7	74	26	65	35	49	51
36	95	5	87	13	84	16	66	34	51	49
37	88	12	92	8	73	27	63	37	66	34

38	92	8	85	15	70	30	63	37	55	45
39	94	6	80	20	77	23	69	31	53	47
40	82	18	90	10	78	22	59	41	63	37
41	96	4	90	10	76	24	67	33	67	33
42	86	14	88	12	65	35	65	35	54	46
43	89	11			77	23	57	43	45	55
44							63	37		
M	88,79	11,21	87,64	12,36	74,93	25,07	63,18	36,82	57,53	42,47
DP	3,91	3,91	6,26	6,26	4,95	4,95	5,44	5,44	6,67	6,67

Anexo 23- Resultados da porcentagem de contagem de parênquima pulmonar (Par) e dos espaços aéreos (EA) dos pulmões esquerdo do grupo nitrofen sem HDC nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5.

NITR	17,5		18,5		19,5		20,5		21,5	
Nº	Par	EA	Par	EA	Par	EA	Par	EA	Par	EA
1	81	19	77	23	62	38	55	45	56	44
2	75	25	86	14	66	34	52	48	65	35
3	79	21	82	18	68	32	46	54	64	36
4	82	18	85	15	69	31	48	52	64	36
5	82	18	78	22	65	35	46	54	54	46
6	81	19	77	23	63	37	48	52	63	37
7	75	25	75	25	64	36	44	56	60	40
8	80	20	78	22	68	32	51	49	56	44
9	86	14	80	20	62	38	46	54	50	50
10	81	19	86	14	72	28	61	39	48	52
11	89	11	86	14	72	28	55	45	68	32
12	86	14	85	15	67	33	49	51	69	31
13	81	19	81	19	60	40	60	40	60	40
14	83	17	71	29	63	37	59	41	58	42
15	85	15	84	16	65	35	53	47	48	52
16	88	12	78	22	58	42	45	55	62	38
17	81	19	78	22	62	38	52	48	54	46
18	81	19	80	20	65	35	47	53	59	41
19	93	7	73	27	66	34	50	50	65	35
20	80	20	74	26	64	36	49	51	56	44
21	87	13	76	24	61	39	49	51	67	33
22	80	20	69	31	72	28	49	51	57	43
23	88	12	75	25	67	33	52	48	61	39
24	85	15	83	17	65	35	50	50	62	38
25	83	17	83	17	63	37	68	32	52	48
26	78	22	82	18	54	46	54	46	64	36
27	85	15	71	29	62	38	46	54	36	64
28	82	18	69	31	71	29	46	54	46	54
29	88	12	80	20	76	24	44	56	42	58
30	74	26	81	19	77	23	44	56	37	63
31	90	10	84	16	72	28	55	45	43	57
32	84	16	81	19	70	30	54	46	30	70
33	85	15	71	29	71	29	45	55	39	61
34	92	8	85	15	76	24	53	47	54	46
35	84	16	78	22	70	30	58	42	38	62
36	88	12	81	19	75	25	59	41	44	56
37	93	7	76	24	74	26	59	41	38	62

38	74	26	87	13	72	28	64	36	41	59
39	95	5	82	18	71	29	70	30	56	44
40	81	19	85	15	68	32	49	51	57	43
41	90	10	84	16	80	20	51	49	60	40
42	85	15	80	20	67	33	60	40	56	44
43	81	19	84	16	73	27	54	46	64	36
44	85	15	80	20	65	35	55	45	65	35
45	87	13	84	16			56	44	62	38
46	95	5	77	23			55	45	64	36
47	84	16	80	20			49	51	68	32
48	77	23	85	15			52	48	60	40
49	80	20	84	16			44	56	57	43
50			77	23			51	49	49	51
51			69	31			58	42	55	45
M	83,86	16,14	79,55	20,45	67,57	32,43	52,33	47,67	54,96	45,04
DP	5,17	5,17	4,96	4,96	5,47	5,47	6,13	6,13	9,80	9,80

Anexo 24- Resultados da porcentagem de contagem de parênquima pulmonar (Par) e dos espaços aéreos (EA) dos pulmões esquerdo do grupo nitrofen com HDC nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5.

CDH Nº	17,5		18,5		19,5		20,5		21,5	
	Par	EA	Par	EA	Par	EA	Par	EA	Par	EA
1	88	12	78	22	75	25	75	25	78	22
2	90	10	81	19	79	21	80	20	71	29
3	86	14	92	8	86	14	76	24	76	24
4	88	12	75	25	80	20	82	18	78	22
5	94	6	72	28	82	18	76	24	84	16
6	94	6	80	20	81	19	83	17	79	21
7	82	18	87	13	81	19	81	19	80	20
8	92	8	95	5	84	16	78	22	86	14
9	89	11	86	14	77	23	78	22	68	32
10	92	8	89	11	79	21	86	14	75	25
11	92	8	88	12	71	29	84	16	71	29
12	91	9	80	20	83	17	83	17	71	29
13	95	5	89	11	73	27	77	23	77	23
14	94	6	85	15	79	21	89	11	78	22
15	85	15	88	12	82	18	82	18	75	25
16	82	18	82	18	73	27	88	12	86	14
17	82	18	86	14	81	19	88	12	81	19
18	90	10	81	19	80	20	83	17	80	20
19	82	18	88	12	71	29	76	24	84	16
20	91	9	88	12	79	21	85	15	83	17
21	82	18	86	14	77	23	83	17	73	27
22	92	8	84	16	80	20	85	15	72	28
23	87	13	90	10	77	23	80	20	82	18
24	93	7	86	14	67	33	86	14	83	17
25	89	11	85	15	82	18	88	12	73	27
26	82	18	90	10	73	27	72	28	77	23
27	91	9	89	11	73	27	84	16	82	18
28	85	15	80	20	82	18	71	29	80	20
29	93	7	88	12	77	23	77	23	79	21
30	88	12	85	15	84	16	76	24	83	17
31	79	21	78	22	80	20	81	19	79	21
32	87	13	90	10	85	15	77	23	85	15
33	88	12	82	18	86	14	84	16	83	17
34	88	12	87	13	81	19	88	12	84	16
35	90	10	88	12	82	18	89	11	86	14
36	87	13	84	16	80	20	88	12	77	23
37	87	13	87	13	81	19	76	24	74	26
38	88	12	84	16	82	18	86	14	77	23
39	86	14	84	16	85	15	81	19	81	19

40	93	7	85	15	84	16	71	29	74	26
41	77	23	82	18	86	14	80	20	81	19
42	88	12	84	16	84	16	82	18	82	18
43	91	9	89	11	87	13	75	25	82	18
44	86	14	82	18	86	14	81	19	83	17
45	77	23	80	20	92	8	74	26	76	24
46	84	16	91	9	80	20	76	24	65	35
47	87	13	84	16			74	26	75	25
48							75	25	81	19
49							72	28	80	20
50							74	26	72	28
51										
M	87,74	12,26	84,98	15,02	80,20	19,80	80,32	19,68	78,44	21,56
DP	4,50	4,50	4,51	4,51	4,90	4,90	5,23	5,23	4,93	4,93

Anexo 25- Resultado das médias dos volumes dos parenquimas pulmonares esquerdo (Vpae) onde $Vpae = VPT \times DAP$ (produto do volume do pulmão esquerdo pela densidade do parênquima pulmonar esquerdo) dos fetos do grupo Controle Externo (CE) e Óleo de Oliva (OO) nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5.

CE	17,5	18,5	19,5	20,5	21,5	OO	17,5	18,5	19,5	20,5	21,5
Nº	Vpae	Vpae	Vpae	Vpae	Vpae	Nº	Vpae	Vpae	Vpae	Vpae	Vpae
1	1232	1998	3198	3675	2592	1	1170	2380	2788	3082	2585
2	1200	2079	3075	3283	2112	2	1222	2380	2911	3128	2632
3	1328	2106	3198	2989	2064	3	1196	2324	3157	2530	3149
4	1232	2187	2952	2695	1968	4	1235	2632	2952	2714	2726
5	1200	2214	2829	2793	2256	5	1183	2436	3362	2944	2867
6	1344	1917	2788	3234	2544	6	1157	2660	3444	2530	3196
7	1248	2052	2870	2989	1440	7	1183	2464	3280	2944	2914
8	1072	2025	2993	3234	2304	8	1144	2604	3116	3036	2867
9	1264	2025	3075	3234	1920	9	1131	2576	3157	3450	3196
10	1376	1836	2788	2989	2112	10	1105	2548	3198	2622	3008
11	1152	2025	3034	3479	1728	11	1144	2352	3075	2530	2679
12	1184	2025	2747	3087	1776	12	1118	2436	3198	2990	2726
13	1232	2052	2542	3136	1872	13	1105	2716	2993	3128	2632
14	1248	1998	2583	2793	2064	14	1157	2436	2993	2990	2820
15	1296	2079	3034	3528	2064	15	1118	2380	2870	2806	3008
16	1296	2241	2829	2989	1776	16	1053	2632	2829	2530	2538
17	1280	1971	2993	3528	2256	17	1079	2520	3362	2760	3102
18	1344	2133	2501	2842	2400	18	1209	2688	2665	3036	2491
19	1408	2106	2583	3381	1680	19	1235	2632	3157	3404	3337
20	1488	2106	2665	3724	1248	20	1170	2464	2665	2898	2726
21	1408	1782	2542	2744	3024	21	1144	2604	3075	2576	2867
22	1408	1944	2460	3234	2880	22	1118	2380	3198	2668	2491
23	1360	2079	2665	3479	2496	23	1170	2212	3239	3358	2585
24	1344	2295	2583	3430	3024	24	1131	2604	3198	3266	2538
25	1328	2349	2296	3283	2256	25	1105	2436	3116	2898	2538
26	1376	2133	2501	3626	2400	26	1144	1960	3198	2714	2444
27	1392	2187	2460	3479	3072	27	1196	2688	2665	2898	2162
28	1248	2160	2419	3038	2400	28	1118	2604	3157	2530	3149
29	1360	2241	2132	2695	3072	29	1222	2240	2993	2622	2303
30	1424	2214	2788	2793	3264	30	1105	2268	2993	2944	2303
31	1280	2268	2255	2940	3456	31	1105	2464	3280	3128	2820
32	1312	2079	2296	3234	2736	32	1079	2100	2870	2990	2209
33	1328	2052	2542	2940	2688	33	1105	2464	3239	2668	2397
34	1392	2133	2624	3087	2544	34	1209	2044	3075	3266	2632
35	1424	2241	2337	2940	2112	35	1183	2604	3034	2990	2303
36	1392	2079	2952	3087	2784	36	1235	2436	3444	3036	2397

37	1328	2106	2378	2940	2352	37	1144	2576	2993	2898	3102
38	1360	2106	2624	3283	2112	38	1196	2380	2870	2898	2585
39	1328	1971	2501	3381	2496	39	1222	2240	3157	3174	2491
40	1376	1890	2624	3087	2640	40	1066	2520	3198	2714	2961
41	1472	1998	2788	2989	2304	41	1248	2520	3116	3082	3149
42	1440	1917	3034	3528		42	1118	2464	2665	2990	2538
43	1472	2025	2870	2940		43	1157		3157	2622	2115
44	1456	1701	2829	2548		44				2898	
45	1360	2106	2911	3185		45					
46	1424	2106	2624	2744		46					
47	1408	1944	3034	3283		47					
48	1488	2268	2989	2695		48					
49	1392			3087		49					
50				3430		50					
M	1337	2074	2709	3132	2348	M	1135	2454	3072	2906	2704
DP	92	132	265	285	490	DP	51	175	203	250	314

Anexo 26- Resultado das médias dos volumes dos parênquimas pulmonares esquerdo (Vpae) onde $Vpae = VPT \times DAP$ (produto do volume do pulmão esquerdo pela densidade do parênquima pulmonar esquerdo) dos fetos do grupo Nitrofen com e sem HDC nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5.

NIT	17,5	18,5	19,5	20,5	21,5	CDH	17,5	18,5	19,5	20,5	21,5
Nº	Vpae	Vpae	Vpae	Vpae	Vpae	Nº	Vpae	Vpae	Vpae	Vpae	Vpae
1	648	1617	2232	2331	2016	1	792	1482	1800	1800	1794
2	600	1806	2376	2553	2340	2	810	1539	1896	1920	1633
3	632	1722	2448	2220	2304	3	774	1748	2064	1824	1748
4	656	1785	2484	2442	2304	4	792	1425	1920	1968	1794
5	656	1638	2340	2627	1944	5	846	1368	1968	1824	1932
6	648	1617	2268	2738	2268	6	846	1520	1944	1992	1817
7	600	1575	2304	2072	2160	7	738	1653	1944	1944	1840
8	640	1638	2448	2331	2016	8	828	1805	2016	1872	1978
9	688	1680	2232	2405	1800	9	801	1634	1848	1872	1564
10	648	1806	2592	2220	1728	10	828	1691	1896	2064	1725
11	712	1806	2592	2516	2448	11	828	1672	1704	2016	1633
12	688	1785	2412	2331	2484	12	819	1520	1992	1992	1633
13	648	1701	2160	2183	2160	13	855	1691	1752	1848	1771
14	664	1491	2268	2294	2088	14	846	1615	1896	2136	1794
15	680	1764	2340	2590	1728	15	765	1672	1968	1968	1725
16	704	1638	2088	2368	2232	16	738	1558	1752	2112	1978
17	648	1638	2232	2109	1944	17	738	1634	1944	2112	1863
18	648	1680	2340	2479	2124	18	810	1539	1920	1992	1840
19	744	1533	2376	2220	2340	19	738	1672	1704	1824	1932
20	640	1554	2304	2294	2016	20	819	1672	1896	2040	1909
21	696	1596	2196	2701	2412	21	738	1634	1848	1992	1679
22	640	1449	2592	2701	2052	22	828	1596	1920	2040	1656
23	704	1575	2412	2738	2196	23	783	1710	1848	1920	1886
24	680	1743	2340	2220	2232	24	837	1634	1608	2064	1909
25	664	1743	2268	2627	1872	25	801	1615	1968	2112	1679
26	624	1722	1944	2664	2304	26	738	1710	1752	1728	1771
27	680	1491	2232	2553	1296	27	819	1691	1752	2016	1886
28	656	1449	2556	2442	1656	28	765	1520	1968	1704	1840
29	704	1680	2736	2405	1512	29	837	1672	1848	1848	1817
30	592	1701	2772	2294	2016	30	792	1615	2016	1824	1909
31	720	1764	2592	2220	2052	31	711	1482	1920	1944	1817
32	672	1701	2520	2109	2160	32	783	1710	2040	1848	1955
33	680	1491	2556	2072	2016	33	792	1558	2064	2016	1909
34	736	1785	2736	2146	2304	34	792	1653	1944	2112	1932
35	672	1638	2520	2442	2340	35	810	1672	1968	2136	1978
36	704	1701	2700	2479	2232	36	783	1596	1920	2112	1771
37	744	1596	2664	2516	2304	37	783	1653	1944	1824	1702
38	592	1827	2592	2220	2448	38	792	1596	1968	2064	1771
39	760	1722	2556	2701	2160	39	774	1596	2040	1944	1863

40	648	1785	2448	2479	2052	40	837	1615	2016	1704	1702
41	720	1764	2880	2627	1764	41	693	1558	2064	1920	1863
42	680	1680	2412	2553	1980	42	792	1596	2016	1968	1886
43	648	1764	2628	2257		43	819	1691	2088	1800	1886
44	680	1680	2340	2627		44	774	1558	2064	1944	1909
45	696	1764		2701		45	693	1520	2208	1776	1748
46	760	1617		2220		46	756	1729	1920	1824	1495
47	672	1680		2368		47	783	1596		1776	1725
48	616	1785		2553		48				1800	1863
49	640	1764				49				1728	1840
50		1617				50				1776	1656
M	671	1671	2432	2416	2091	M	790	1615	1925	1928	1804
DP	41	104	197	195	261	DP	41	86	118	125	113

Anexo 27- Resultados da contagem de 50 campos dos pontos imuno-marcados para os receptores de VEGF-1 de fetos do grupo Controle Externo (CE) nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5.

CE N°	17,5		18,5		19,5		20,5		21,5	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1	30	70	30	70	23	77	24	76	33	67
2	29	71	33	67	28	72	20	80	22	78
3	28	72	30	70	15	85	23	77	20	80
4	20	80	30	70	25	75	23	77	23	77
5	25	75	27	73	34	66	31	69	26	74
6	22	78	28	72	27	73	25	75	26	74
7	29	71	29	71	35	65	32	68	34	66
8	24	76	26	74	34	66	20	80	30	70
9	26	74	26	74	23	77	26	74	20	80
10	15	85	31	69	36	64	35	65	24	76
11	23	77	28	72	27	73	35	65	25	75
12	22	78	22	78	25	75	28	72	31	69
13	23	77	20	80	28	72	26	74	21	79
14	22	78	32	68	27	73	28	72	20	80
15	26	74	22	78	40	60	30	70	27	73
16	28	72	23	77	26	74	29	71	23	77
17	30	70	28	72	28	72	30	70	25	75
18	22	78	20	80	25	75	40	60	18	82
19	27	73	30	70	23	77	33	67	29	71
20	28	72	28	72	27	73	27	73	22	78
21	28	72	25	75	22	78	25	75	29	71
22	28	72	30	70	30	70	20	80	23	77
23	30	70	25	75	20	80	22	78	24	76
24	29	71	25	75	32	68	21	79	26	74
25	31	69	24	76	25	75	23	77	23	77
26	32	68	31	69	20	80	24	76	27	73
27	30	70	25	75	36	64	33	67	24	76
28	32	68	24	76	26	74	28	72	32	68
29	25	75	27	73	29	71	27	73	31	69
30	30	70	22	78	18	82	31	69	22	78
31	21	79	36	64	24	76	31	69	27	73
32	28	72	27	73	31	69	25	75	27	73
33	29	71	26	74	23	77	22	78	24	76
34	24	76	32	68	32	68	20	80	22	78
35	21	79	23	77	31	69	28	72	20	80
36	28	72	24	76	27	73	23	77	27	73
37	30	70	28	72	28	72	28	72	34	66
38	22	78	23	77	19	81	37	63	29	71
39	31	69	20	80	27	73	27	73	30	70

40	29	71	29	71	20	80	25	75	25	75
41	24	76	33	67	25	75	25	75	23	77
42	20	80	25	75	35	65	20	80	30	70
43	25	75	29	71	33	67	34	66	23	77
44	20	80	30	70	25	75	17	83	24	76
45	28	72	22	78	23	77	20	80	27	73
46	29	71	29	71	25	75	26	74	23	77
47	28	72	33	67	20	80	31	69	25	75
48	30	70	35	65	28	72	25	75	23	77
49	40	60	33	67	15	85	27	73	27	73
50	25	75	30	70	23	77	31	69	25	75
M	27	73	27	73	27	73	27	73	26	75
DP	4	4	4	4	5	5	5	5	4	4

Anexo 28- Resultados da contagem de 50 campos dos pontos imuno-marcados para os receptores de VEGF-1 de fetos do grupo Óleo de Oliva (OO) nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5.

OO Nº	17,5		18,5		19,5		20,5		21,5	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1	34	66	42	58	24	76	20	80	30	70
2	32	68	25	75	20	80	31	69	34	66
3	40	60	28	72	20	80	30	70	29	71
4	40	60	36	64	24	76	27	73	31	69
5	30	70	30	70	27	73	25	75	35	65
6	29	71	32	68	28	72	32	68	38	62
7	35	65	25	75	24	76	35	65	32	68
8	29	71	32	68	21	79	38	62	39	61
9	30	70	35	65	18	82	35	65	39	61
10	26	74	40	60	28	72	33	67	47	53
11	25	75	33	67	30	70	30	70	38	62
12	36	64	34	66	21	79	25	75	39	61
13	38	62	34	66	20	80	30	70	30	70
14	37	63	32	68	24	76	28	72	35	65
15	31	69	29	71	27	73	33	67	37	63
16	25	75	36	64	27	73	31	69	30	70
17	34	66	29	71	36	64	31	69	25	75
18	37	63	30	70	33	67	30	70	39	61
19	40	60	31	69	30	70	36	64	28	72
20	45	55	32	68	30	70	40	60	27	73
21	25	75	32	68	32	68	34	66	40	60
22	38	62	36	64	36	64	33	67	30	70
23	32	68	40	60	38	62	33	67	27	73
24	34	66	32	68	45	55	30	70	39	61
25	27	73	25	75	34	66	32	68	27	73
26	20	80	34	66	25	75	31	69	33	67
27	20	80	37	63	50	50	27	73	43	57
28	30	70	36	64	31	69	30	70	37	63
29	40	60	26	74	50	50	42	58	35	65
30	36	64	38	62	33	67	36	64	26	74
31	33	67	35	65	35	65	38	62	29	71
32	45	55	30	70	36	64	47	53	40	60
33	40	60	27	73	32	68	39	61	35	65
34	42	58	35	65	22	78	35	65	41	59
35	28	72	35	65	20	80	37	63	37	63
36	46	54	22	78	24	76	30	70	22	78
37	34	66	12	88	29	71	38	62	25	75
38	27	73	29	71	34	66	35	65	20	80
39	35	65	24	76	35	65	38	62	34	66

40	34	66	19	81	38	62	28	72	34	66
41	28	72	38	62	20	80	50	50	50	50
42	30	70	48	52	41	59	39	61	9	91
43	38	62	35	65	37	63	34	66	19	81
44	29	71	35	65	47	53	39	61	26	74
45	33	67	41	59	30	70	35	65	14	86
46	30	70	36	64	39	61	40	60	21	79
47	30	70	35	65	33	67	37	63	16	84
48	43	57	35	65	32	68	35	65	36	64
49	30	70	43	57	30	70	35	65	35	65
50	29	71	37	63	41	59	38	62	24	76
M	33	67	33	67	31	69	34	66	32	68
DP	6	6	6	6	8	8	5	5	8	8

Anexo 29- Resultados da contagem de 50 campos dos pontos imuno-marcados para os receptores de VEGF-1 de fetos do grupo Nitrofen sem CDH nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5.

NITR Nº	17,5		18,5		19,5		20,5		21,5	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1	50	50	59	41	37	63	31	69	32	68
2	54	46	58	42	53	47	32	68	40	60
3	54	46	48	52	43	57	52	48	39	61
4	56	44	64	36	45	55	26	74	37	63
5	45	55	57	43	43	57	27	73	36	64
6	50	50	50	50	40	60	25	75	34	66
7	48	52	62	38	45	55	30	70	30	70
8	54	46	50	50	40	60	32	68	47	53
9	51	49	54	46	46	54	21	79	43	57
10	47	53	49	51	48	52	22	78	47	53
11	46	54	50	50	53	47	34	66	50	50
12	45	55	52	48	45	55	23	77	46	54
13	45	55	50	50	51	49	32	68	54	46
14	51	49	43	57	45	55	26	74	44	56
15	51	49	60	40	43	57	31	69	43	57
16	48	52	50	50	47	53	29	71	38	62
17	55	45	43	57	52	48	30	70	40	60
18	60	40	62	38	51	49	30	70	55	45
19	51	49	59	41	46	54	33	67	50	50
20	67	33	52	48	53	47	40	60	48	52
21	56	44	52	48	47	53	22	78	48	52
22	51	49	64	36	51	49	20	80	60	40
23	53	47	54	46	60	40	36	64	40	60
24	47	53	43	57	40	60	33	67	46	54
25	60	40	51	49	47	53	29	71	41	59
26	53	47	61	39	52	48	31	69	32	68
27	65	35	60	40	49	51	32	68	40	60
28	65	35	58	42	42	58	52	48	39	61
29	70	30	53	47	54	46	26	74	37	63
30	70	30	50	50	30	70	27	73	36	64
31	56	44	60	40	40	60	25	75	34	66
32	60	40	62	38	42	58	30	70	30	70
33	55	45	60	40	50	50	32	68	47	53
34	60	40	43	57	35	65	21	79	43	57
35	47	53	51	49	48	52	22	78	47	53
36	57	43	49	51	40	60	34	66	50	50
37	58	42	50	50	46	54	23	77	46	54
38	63	37	57	43	40	60	32	68	54	46
39	63	37	51	49	40	60	26	74	44	56

40	60	40	56	44	40	60	31	69	43	57
41	63	37	53	47	45	55	29	71	38	62
42	70	30	50	50	40	60	30	70	40	60
43	58	42	47	53	46	54	30	70	55	45
44	61	39	48	52	48	52	33	67	50	50
45	55	45	46	54	53	47	40	60	48	52
46	45	55	54	46	45	55	22	78	48	52
47	59	41	49	51	51	49	20	80	60	40
48	52	48	57	43	45	55	36	64	40	60
49	59	41	60	40	43	57	33	67	46	54
50	59	41	56	44	47	53	29	71	41	59
M	56	44	54	46	46	54	45	55	44	56
DP	7	7	6	6	6	6	5	5	7	7

Anexo 30- Resultados da contagem de 50 campos dos pontos imuno-marcados para os receptores de VEGF-1 de fetos do grupo Nitrofen com CDH nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5.

CDH Nº	17,5		18,5		19,5		20,5		21,5	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1	40	60	34	66	60	40	47	53	45	55
2	41	59	40	60	65	35	66	34	43	57
3	32	68	40	60	58	42	50	50	48	52
4	30	70	60	40	66	34	60	40	44	56
5	49	51	48	52	60	40	50	50	45	55
6	27	73	43	57	59	41	50	50	48	52
7	31	69	38	62	58	42	48	52	45	55
8	34	66	38	62	65	35	50	50	45	55
9	33	67	50	50	71	29	46	54	42	58
10	40	60	40	60	60	40	49	51	45	55
11	34	66	40	60	62	38	47	53	40	60
12	35	65	57	43	52	48	51	49	44	56
13	40	60	63	37	38	62	54	46	47	53
14	38	62	40	60	51	49	43	57	47	53
15	32	68	40	60	43	57	53	47	54	46
16	34	66	50	50	50	50	39	61	50	50
17	34	66	49	51	50	50	47	53	40	60
18	31	69	45	55	50	50	70	30	51	49
19	36	64	48	52	44	56	50	50	43	57
20	35	65	38	62	55	45	45	55	47	53
21	34	66	43	57	50	50	50	50	58	42
22	40	60	52	48	50	50	60	40	48	52
23	33	67	35	65	52	48	38	62	52	48
24	37	63	40	60	48	52	50	50	43	57
25	38	62	52	48	55	45	44	56	50	50
26	30	70	48	52	52	48	55	45	50	50
27	35	65	50	50	55	45	40	60	40	60
28	35	65	40	60	52	48	40	60	51	49
29	50	50	45	55	62	38	50	50	43	57
30	49	51	46	54	59	41	50	50	47	53
31	53	47	52	48	44	56	45	55	58	42
32	56	44	45	55	47	53	45	55	48	52
33	53	47	50	50	45	55	51	49	52	48
34	34	66	35	65	44	56	47	53	43	57
35	34	66	43	57	48	52	55	45	50	50
36	31	69	43	57	48	52	48	52	48	52
37	36	64	44	56	32	68	40	60	44	56
38	35	65	50	50	45	55	37	63	45	55
39	34	66	45	55	50	50	45	55	48	52

40	40	60	45	55	40	60	36	64	45	55
41	33	67	47	53	60	40	50	50	45	55
42	37	63	40	60	65	35	42	58	42	58
43	38	62	33	67	58	42	53	47	45	55
44	30	70	36	64	66	34	30	70	50	50
45	35	65	49	51	60	40	51	49	48	52
46	35	65	54	46	59	41	47	53	46	54
47	50	50	60	40	58	42	55	45	47	53
48	49	51	70	30	65	35	48	52	45	55
49	53	47	47	53	71	29	40	60	43	57
50	52	48	45	55	64	36	37	63	44	56
M	38	62	46	54	54	46	48	52	47	53
DP	7	7	8	8	9	9	7	7	4	4

Anexo 31- Resultados da contagem de 50 campos dos pontos imuno-marcados para os receptores de VEGF-2 de fetos do grupo Controle Externo (CE) nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5.

CE Nº	17,5		18,5		19,5		20,5		21,5	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1	33	67	20	80	34	66	28	72	30	70
2	18	82	36	64	34	66	25	75	33	67
3	32	68	33	67	30	70	33	67	28	72
4	22	78	32	68	23	77	45	55	24	76
5	29	71	25	75	36	64	38	62	21	79
6	20	80	29	71	25	75	34	66	33	67
7	27	73	27	73	33	67	45	55	34	66
8	20	80	33	67	37	63	38	62	30	70
9	28	72	39	61	44	56	50	50	27	73
10	19	81	35	65	40	60	48	52	37	63
11	38	62	45	55	48	52	43	57	32	68
12	29	71	30	70	38	62	50	50	35	65
13	35	65	40	60	44	56	30	70	34	66
14	23	77	31	69	37	63	44	56	30	70
15	36	64	39	61	44	56	43	57	32	68
16	34	66	45	55	35	65	47	53	30	70
17	31	69	50	50	25	75	35	65	26	74
18	20	80	34	66	48	52	26	74	25	75
19	23	77	40	60	30	70	33	67	26	74
20	23	77	40	60	20	80	30	70	24	76
21	24	76	41	59	30	70	40	60	27	73
22	28	72	45	55	22	78	39	61	24	76
23	27	73	45	55	22	78	34	66	20	80
24	23	77	42	58	32	68	40	60	21	79
25	20	80	44	56	28	72	34	66	30	70
26	20	80	46	54	32	68	36	64	28	72
27	26	74	38	62	30	70	34	66	27	73
28	20	80	32	68	40	60	41	59	23	77
29	32	68	38	62	35	65	32	68	29	71
30	15	85	37	63	32	68	34	66	33	67
31	25	75	40	60	45	55	36	64	28	72
32	20	80	35	65	40	60	35	65	20	80
33	15	85	30	70	32	68	30	70	19	81
34	34	66	36	64	35	65	36	64	23	77
35	29	71	34	66	24	76	35	65	20	80
36	32	68	33	67	34	66	34	66	24	76
37	24	76	32	68	32	68	28	72	19	81
38	30	70	20	80	30	70	26	74	30	70
39	40	60	30	70	36	64	30	70	27	73

40	33	67	40	60	35	65	41	59	27	73
41	31	69	44	56	30	70	41	59	19	81
42	32	68	36	64	35	65	43	57	30	70
43	20	80	29	71	38	62	44	56	20	80
44	32	68	30	70	36	64	30	70	26	74
45	38	62	31	69	35	65	37	63	26	74
46	34	66	37	63	26	74	37	63	28	72
47	31	69	33	67	38	62	34	66	27	73
48	31	69	38	62	45	55	32	68	20	80
49	28	72	27	73	28	72	40	60	22	78
50	30	70	30	70	30	70	34	66	30	70
M	27	73	36	64	34	66	37	63	27	73
DP	6	6	7	7	7	7	6	6	5	5

Anexo 32- Resultado da contagem de 50 campos dos pontos imuno-marcados para os receptores de VEGF-2 de fetos do grupo Óleo de Oliva (OO) nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5.

OO Nº	17,5		18,5		19,5		20,5		21,5	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1	31	69	35	65	31	69	34	66	33	67
2	28	72	43	57	26	74	26	74	20	80
3	32	68	44	56	22	78	31	69	31	69
4	20	80	36	64	25	75	23	77	20	80
5	31	69	42	58	30	70	28	72	32	68
6	30	70	33	67	20	80	30	70	35	65
7	31	69	30	70	34	66	35	65	28	72
8	30	70	34	66	22	78	28	72	28	72
9	31	69	43	57	38	62	26	74	20	80
10	28	72	42	58	31	69	30	70	25	75
11	34	66	50	50	30	70	30	70	23	77
12	44	56	35	65	25	75	35	65	23	77
13	41	59	35	65	36	64	30	70	29	71
14	34	66	31	69	33	67	20	80	20	80
15	40	60	35	65	35	65	22	78	28	72
16	30	70	35	65	36	64	24	76	34	66
17	36	64	38	62	30	70	25	75	24	76
18	43	57	45	55	32	68	35	65	23	77
19	41	59	38	62	29	71	32	68	24	76
20	37	63	30	70	24	76	36	64	29	71
21	45	55	33	67	39	61	35	65	24	76
22	46	54	44	56	36	64	32	68	27	73
23	46	54	44	56	30	70	25	75	27	73
24	38	62	51	49	28	72	32	68	28	72
25	39	61	42	58	21	79	27	73	24	76
26	44	56	40	60	34	66	24	76	28	72
27	35	65	43	57	23	77	18	82	28	72
28	40	60	38	62	30	70	20	80	20	80
29	30	70	40	60	32	68	22	78	25	75
30	39	61	30	70	29	71	25	75	23	77
31	40	60	30	70	36	64	38	62	23	77
32	30	70	33	67	33	67	21	79	29	71
33	36	64	43	57	24	76	22	78	20	80
34	41	59	50	50	26	74	23	77	28	72
35	26	74	32	68	25	75	34	66	34	66
36	31	69	18	82	22	78	29	71	24	76
37	35	65	30	70	38	62	24	76	23	77
38	29	71	30	70	36	64	31	69	24	76
39	32	68	25	75	26	74	24	76	29	71

40	37	63	20	80	37	63	23	77	33	67
41	30	70	30	70	39	61	33	67	20	80
42	36	64	32	68	31	69	30	70	31	69
43	31	69	29	71	32	68	26	74	20	80
44	15	85	28	72	35	65	32	68	32	68
45	26	74	32	68	23	77	27	73	35	65
46	26	74	32	68	25	75	31	69	28	72
47	25	75	41	59	26	74	35	65	30	70
48	21	79	49	51	30	70	28	72	32	68
49	27	73	43	57	39	61	26	74	35	65
50	35	65	46	54	30	70	25	75	23	77
M	34	66	36	64	30	70	28	72	27	73
DP	7	7	7	7	5	5	5	5	5	5

Anexo 33- Resultados da contagem de 50 campos dos pontos imuno-marcados para os receptores de VEGF-2 de fetos do grupo Nitrofen sem CDH nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5.

NITR Nº	17,5		18,5		19,5		20,5		21,5	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1	40	60	47	53	40	60	28	72	28	72
2	50	50	52	48	43	57	33	67	27	73
3	52	48	48	52	42	58	27	73	22	78
4	44	56	48	52	44	56	20	80	21	79
5	40	60	47	53	41	59	21	79	22	78
6	55	45	52	48	50	50	27	73	26	74
7	58	42	53	47	43	57	30	70	26	74
8	48	52	51	49	35	65	25	75	25	75
9	55	45	53	47	47	53	29	71	22	78
10	52	48	55	45	43	57	28	72	32	68
11	55	45	51	49	44	56	27	73	25	75
12	55	45	55	45	50	50	29	71	29	71
13	48	52	41	59	53	47	27	73	32	68
14	40	60	54	46	50	50	30	70	37	63
15	42	58	57	43	55	45	35	65	40	60
16	53	47	40	60	60	40	35	65	40	60
17	58	42	45	55	50	50	35	65	30	70
18	57	43	53	47	51	49	30	70	30	70
19	63	37	56	44	50	50	27	73	21	79
20	60	40	53	47	35	65	36	64	31	69
21	50	50	55	45	40	60	38	62	36	64
22	63	37	60	40	40	60	33	67	30	70
23	54	46	58	42	44	56	32	68	22	78
24	60	40	50	50	45	55	34	66	30	70
25	68	32	43	57	39	61	31	69	27	73
26	70	30	48	52	40	60	40	60	32	68
27	67	33	32	68	50	50	38	62	28	72
28	71	29	33	67	45	55	39	61	31	69
29	67	33	45	55	55	45	37	63	21	79
30	60	40	47	53	55	45	40	60	23	77
31	58	42	50	50	56	44	50	50	30	70
32	62	38	51	49	52	48	36	64	25	75
33	60	40	40	60	54	46	34	66	30	70
34	52	48	40	60	55	45	40	60	30	70
35	42	58	60	40	60	40	47	53	29	71
36	65	35	44	56	60	40	42	58	26	74
37	52	48	57	43	52	48	38	62	23	77
38	50	50	48	52	55	45	48	52	26	74
39	63	37	54	46	65	35	34	66	41	59

40	68	32	40	60	65	35	37	63	23	77
41	60	40	40	60	55	45	36	64	27	73
42	57	43	51	49	50	50	35	65	30	70
43	70	30	46	54	50	50	33	67	25	75
44	66	34	52	48	41	59	36	64	20	80
45	56	44	53	47	55	45	40	60	24	76
46	65	35	50	50	51	49	40	60	30	70
47	67	33	50	50	46	54	41	59	28	72
48	69	31	51	49	57	43	35	65	29	71
49	65	35	40	60	60	40	36	64	21	79
50	56	44	40	60	50	50	35	65	26	74
M	57	43	49	51	49	51	34	66	28	72
DP	9	9	7	7	7	7	6	6	5	5

Anexo 34- Resultados da contagem de 50 campos dos pontos imuno-marcados para os receptores de VEGF-2 de fetos do grupo Nitrofen com CDH nos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5.

CDH Nº	17,5		18,5		19,5		20,5		21,5	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1	50	50	59	41	43	57	35	65	40	60
2	45	55	45	55	44	56	27	73	40	60
3	38	62	52	48	50	50	34	66	50	50
4	39	61	47	53	53	47	45	55	42	58
5	40	60	32	68	46	54	42	58	44	56
6	30	70	49	51	57	43	38	62	47	53
7	37	63	35	65	45	55	42	58	49	51
8	41	59	47	53	42	58	41	59	48	52
9	34	66	41	59	35	65	42	58	49	51
10	34	66	35	65	62	38	40	60	50	50
11	42	58	48	52	60	40	40	60	51	49
12	40	60	50	50	47	53	50	50	48	52
13	42	58	49	51	40	60	43	57	60	40
14	47	53	52	48	40	60	50	50	62	38
15	45	55	41	59	39	61	43	57	43	57
16	50	50	54	46	45	55	44	56	44	56
17	40	60	35	65	44	56	46	54	45	55
18	66	34	48	52	46	54	45	55	46	54
19	36	64	46	54	50	50	47	53	50	50
20	50	50	46	54	52	48	39	61	55	45
21	54	46	52	48	56	44	50	50	53	47
22	41	59	41	59	52	48	44	56	52	48
23	41	59	48	52	39	61	47	53	51	49
24	45	55	46	54	55	45	45	55	45	55
25	48	52	42	58	52	48	48	52	42	58
26	45	55	45	55	57	43	46	54	39	61
27	54	46	40	60	44	56	41	59	48	52
28	51	49	51	49	55	45	42	58	47	53
29	40	60	43	57	68	32	43	57	25	75
30	48	52	49	51	43	57	55	45	30	70
31	58	42	35	65	35	65	35	65	32	68
32	45	55	43	57	62	38	27	73	32	68
33	52	48	46	54	60	40	34	66	48	52
34	45	55	42	58	47	53	45	55	47	53
35	54	46	47	53	40	60	42	58	25	75
36	30	70	55	45	40	60	38	62	35	65
37	44	56	46	54	39	61	42	58	40	60
38	52	48	39	61	45	55	41	59	30	70
39	46	54	45	55	44	56	42	58	41	59

40	51	49	41	59	46	54	40	60	40	60
41	50	50	49	51	50	50	40	60	35	65
42	55	45	48	52	52	48	50	50	31	69
43	49	51	49	51	56	44	43	57	40	60
44	38	62	49	51	52	48	50	50	45	55
45	50	50	32	68	39	61	43	57	41	59
46	50	50	40	60	55	45	44	56	35	65
47	45	55	52	48	52	48	44	56	32	68
48	49	51	52	48	57	43	45	55	36	64
49	50	50	46	54	44	56	46	54	50	50
50	55	45	48	52	55	45	41	59	42	58
M	46	54	45	55	49	51	43	57	43	57
DP	7	7	6	6	8	8	5	5	8	8

