

AUGUSTO FREDERICO SANTOS SCHMIDT

**EFEITO DO TRATAMENTO PRÉ-NATAL COM ÁCIDO RETINÓICO
NA EXPRESSÃO PULMONAR VEGF E SEUS RECEPTORES NO
MODELO ANIMAL DE HÉRNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÊNITA
INDUZIDA PELO NITROFEN**

CAMPINAS

2010

AUGUSTO FREDERICO SANTOS SCHMIDT

**EFEITO DO TRATAMENTO PRÉ-NATAL COM ÁCIDO RETINÓICO NA
EXPRESSÃO PULMONAR DE VEGF E SEUS RECEPTORES VEGFR1 E VEGFR2
NO MODELO ANIMAL 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 de título de
Doutor em Ciências da Cirurgia.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

CAMPINAS

2010

iii

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sch56e Schmidt, Augusto Frederico Santos
 Efeito do tratamento pré-natal com ácido retinóico na expressão
 pulmonar de VEGF e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2 no modelo
 animal de hérnia diafragmática congênita induzida pelo nitrofen /
 Augusto Frederico Santos Schmidt. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

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

1. Feto - Anomalias. 2. Anomalias congênicas. 3. Hérnia. 4.
Modelo experimental. 5. Angiogênese. I. Sbragia Neto, Lourenço.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Effect of antenatal retinoic acid treatment on the
expression of VEGF and its receptors VEGFR1 and VEGFR2 in the animal
model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia**

Keywords: • Fetus, abnormalities
 • Congenital abnormalities
 • Hernia
 • Experimental model
 • Angiogenesis

Titulação: Doutor em Ciências da Cirurgia

Banca examinadora:

**Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto
Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro
Prof. Dr. Márcio Lopes Miranda
Profa. Dra. Ana Cristina Aoun Tannuri
Prof. Dr. Flávio de Oliveira Pileggi**

Data da defesa: 01-06-2010

Banca Examinadora da Defesa de Doutorado

Augusto Frederico Santos Schmidt

Orientador: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Membros:

1. Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto -

2. Profa. Dra. Ana Cristina Aoun Tannuri -

3. Prof. Dr. Flávio de Oliveira Pileggi -

4. Prof. Dr. Antonio Gonçalves de Oliveira Filho -

5. Prof. Dr. Jose Dirceu Ribeiro

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 01/06/2010

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Por ter me ajudado a trilhar meu caminho desde a graduação e me orientado na ciência e na vida.

Aos meus pais Adolfo José Schmidt e Scheilla Luiza Santos Schmidt e ao meu irmão Marcello Frederico Santos Schmidt

Pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim.

À minha namorada Fernanda Silva Bellodi

Pelo companheirismo e amor mesmo durante meus finais de semana no laboratório.

À Frances Lilian Lanhellas Gonçalves

Pela amizade e ajuda indispensável neste trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica

Aline Cristina Régis, Carolina Teixeira Resende Barreto, Fábio Santana de Oliveira e Maidane Luisi Pereira Costa Maia pela convivência e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Violin Dias Pereira e alunos

Pela colaboração neste trabalho e por disponibilizar seu laboratório para o desenvolvimento de parte deste trabalho;

À Profa. Dra. Maria Heloísa Souza Lima Blotta e alunos

Por disponibilizarem a estrutura de seu laboratório para realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. Ibsen Bellini Coimbra

Por disponibilizarem a estrutura de seu laboratório e colaborarem na realização deste trabalho.

À Paula Léa, Secretária da Pós-Graduação

Pela dedicação e ajuda para tornar esta tese possível

À FAPESP

Pela bolsa #09/52772-9 e pelo Auxílio à Pesquisa 09/50347-9 do qual fez parte minha tese de doutorado

EPÍGRAFE

*“Our wills and fates do so contrary run
That our devices still are overthrown;
Our thoughts are ours, their ends none of our own.”*

Shakespeare (*Macbeth* Ato III, Cena II)

SUMÁRIO

RESUMO.....	xvii
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUÇÃO	45
2. OBJETIVO	51
2.1 Geral	53
2.2 Específicos	53
3. MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1- Avaliação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	57
3.2- Animais e obtenção de fêmeas prenhes	57
3.3- Formação dos grupos experimentais	57
3.4- Coleta das amostras	58
3.5- Análise morfológica do diafragma e do pulmão	58
3.6- Processamento para análise morfométrica e imunoistoquímica.....	59
3.7- Análise da morfometria pulmonar	59
3.8- Análise da morfometria vascular	60
3.9- Imunoistoquímica para VEGF e receptores VEGFR1 e VEGFR2	60
3.10- Análise semiquantitativa da imunoistoquímica.....	61
3.11- Análise por Western Blotting	61
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
5. RESULTADOS	67
5.1- Análise macroscópica.....	69
5.2- Análise da morfometria pulmonar	74
5.3- Análise da morfometria vascular	76
5.4- Análise por imunoistoquímica	78
5.4- Análise por Western Blotting	82
6. DISCUSSÃO	89
7. CONCLUSÃO.....	95
7.1 Geral	96
7.1 Específicas	96

8. REFERÊNCIAS	99
8. APÊNDICES	109

RESUMO

A hérnia diafragmática congênita (HDC) é uma doença grave com alta mortalidade devido à hipoplasia e hipertensão pulmonar. A via do ácido retinóico tem sido implicada na patogênese da HDC e pode ser uma alternativa de intervenção na promoção da alveolarização e vascularização pulmonar. O fator de crescimento vascular do endotélio (*VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor*) e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2 têm importante função no crescimento e na vascularização pulmonar, e, possivelmente, na patogênese da HDC. No entanto, não se conhece como o tratamento pré-natal com ácido retinóico pode afetar a vascularização pulmonar e seus fatores de crescimento. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito do tratamento pré-natal com ácido retinóico na vascularização pulmonar e na expressão pulmonar de VEGF e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2 em fetos de rato com HDC induzida pelo nitrofen (2,4-dicloro-4'-nitrodifenil éter). Fetos de ratas Sprague-Dawley prenhes foram divididos em oito grupos: 1) controle externo, 2) placebo óleo nitrofen; 3) placebo óleo ácido retinóico, 4) tratados com ácido retinóico, 5) expostos ao nitrofen sem HDC, 6) expostos ao nitrofen com HDC, 7) expostos ao nitrofen sem HDC e tratados com ácido retinóico, 8) expostos ao nitrofen com HDC e tratados com ácido retinóico. Nitrofen foi administrado por via oral (gavagem) com 9,5 dias de gestação. Ácido retinóico foi administrado por via intraperitoneal com 18,5, 19,5 e 20,5 dias de gestação na dose de 5 mg/kg/dia, a coleta fetal foi realizada com 21,5 dias (termo=22 dias). Cada grupo fetal foi composto por 25 fetos. As variáveis morfológicas estudadas foram: peso corporal (PC), peso pulmonar total (PPT), peso do pulmão esquerdo (PPE) e a relação peso pulmonar total / peso corporal (PPT/PC). A morfologia pulmonar foi estudada pela mensuração da média linear de interceptação (MLI) e seus componentes diâmetro interno dos espaços aéreos (DEA) e a relação de comprimento de transecção do parênquima / espaço aéreo (MCTP). A morfologia vascular foi estudada pela mensuração do diâmetro externo (DE), diâmetro interno (DI) e espessura proporcional da camada muscular média (ECM) de arteríolas pulmonares de resistência. A expressão de VEGF e dos receptores VEGFR1 e VEGFR2 foi analisada por meio de imunoistoquímica e western blotting. Os dados morfológicos e morfométricos foram analisados pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer, a avaliação semiquantitativa da imunoistoquímica foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$ para ambos os testes. A frequência de HDC observada entre os fetos expostos ao

nitrofen foi de 40%. As variáveis morfológicas apresentaram diminuição significativa nos grupos expostos ao nitrofen, especialmente nos fetos com HDC ($p<0,05$). O tratamento com ácido retinóico não alterou as variáveis morfométricas pulmonares. Fetos com HDC apresentaram aumento da ECM, enquanto o tratamento com ácido retinóico reduziu a ECM nos fetos com HDC ($p<0.001$). A presença de HDC levou à diminuição da expressão de VEGF, VEGFR1 e VEGFR2, enquanto o tratamento com ácido retinóico recuperou a expressão de VEGF e VEGFR1. A alteração sinalização da via do VEGF na HDC pode estar associada à patogênese da hipoplasia e da hipertensão pulmonar. O tratamento pré-natal com ácido retinóico pode fornecer vias para tratamento da hipertensão pulmonar na HDC por meio da redução da ECM das arteríolas pulmonares e recuperação do VEGF e seus receptores.

ABSTRACT

Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is a life-threatening disease with high mortality due to the pulmonary hypertension and hypoplasia. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors VEGFR1 and VEGFR2 play a major role in lung vascularization, growth, and possibly in the pathogenesis of CDH. However it is not know how prenatal treatment with retinoic acid can affect lung vascularization by acting on the VEGF signaling. The purpose of this study was to analyze the effect of antenatal retinoic acid treatment on the expression of pulmonary VEGF and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in rat fetuses with CDH induced by nitrofen. Fetuses from pregnant Sprague-Dawley rats (term=22 days) were divided in eight groups: 1) external control, 2) placebo oil nitrofen, 3) placebo oil retinoic acid, 4) treated with retinoic acid, 5) exposed to nitrofen without CDH, 6) exposed to nitrofen with CDH, 7) exposed to nitrofen without CDH and treated with retinoic acid, 8) exposed to nitrofen with CDH and treated with retinoic acid. Nitrofen (2,4- dichloro-4'-nitro**diphenyl** ether) was administered by gavage (100 mg) at 9,5 days of gestation. Retinoic acid was administered intraperitoneally on days 18.5, 19.5 and 20.5 of gestation (5 mg/kg), harvest was performed at 21.5 days (term =22 days). Each fetal subgroup was composed of 25 fetuses. The morphologic variables studied were: body weight, total lung weight, left lung weight, and total lung weight to body weight ratio. Pulmonary morphometry was studied by measuring the mean linear intercept and its components: internal diameter of airspaces and mean transection length / airspace. Vascular morphometry was studied by measuring the external diameter, internal diameter and proportionate thickness of the medial muscular layer of pulmonary resistance arterioles. Immunohistochemistry and Western blotting analysis were used to assess VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 expression. Data was analyzed using ANOVA with Tukey's post-test and immunohistochemistry was studied semiquantitatively using Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. The frequency of CDH was 40%. The morphological variables showed reduction in the nitrofen group with and without CDH, which were more pronounced in the latter ($p<0.05$). Retinoic acid did not affect fetal morphology. There was no difference in pulmonary morphometry among groups. Fetuses with CDH had increased proportionate thickness of the medial muscular layer of pulmonary arterioles, while treatment with retinoic acid reduced this variable in fetuses with CDH ($p<0.001$). Fetuses with CDH had reduced VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 expression, while retinoic acid treatment restored expression

VEGF and VEGFR1. VEGF signaling disruption may be associated with pulmonary hypertension in CDH. Retinoic acid may provide a pathway for acting on pulmonary hypertension by reducing medial thickness of pulmonary arterioles and restoring expression of VEGF and its receptors.

Lista de abreviaturas

BSA	Albumina bovina sérica
CA	Grupo Controle ácido retinóico
CE	Grupo controle externo
DE	Diâmetro externo
DEA	Diâmetro interno de espaço aéreo
DG	Dias gestacionais
DI	Diâmetro interno
ECM	Espessura da camada muscular média
HDC	Hérnia diafragmática congênita
MCTP	Média de comprimento de transecção do parênquima
MLI	Média linear de intersecção
N-	Grupo nitrofen sem hérnia diafragmática congênita
N+	Grupo nitrofen com hérnia diafragmática congênita
NA-	Grupo nitrofen sem hérnia diafragmática congênita tratado com ácido retinóico
NA+	Grupo nitrofen com hérnia diafragmática congênita tratado com ácido retinóico
NI	Número de intersecções
ON	Grupo placebo óleo de oliva nitrofen
OA	Grupo placebo óleo de oliva ácido retinóico
PBS	Tampão fosfato salina
PC	Peso Corporal
PPE	Peso do pulmão esquerdo
PPT	Peso pulmonar total
PPT/PC	Relação peso pulmonar total / peso corporal
RALDH2	Retinaldesidrogenase 2
TBS	Tampão tris-salina
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR1	Receptor 1 do fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR2	Receptor 2 do fator de crescimento vascular endotelial

Lista de notações

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
μL	Microlitro
μm	Micrômetros
G	Gauge – calibre de agulha
kDa	kilodáton
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	milimolar
n	Número de amostra
rpm	rotações por minuto
s	segundos
V	Volts

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1- Distribuição dos valores de peso corporal (PC), peso pulmonar total (PPT), peso do pulmão esquerdo (PPE) e relação PPT/PC, em mg, expressos por médias $\pm$ desvio padrão. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	69
Tabela 2- Distribuição dos valores de média linear de interceptação (MLI), diâmetro de espaço aéreo (DEA), média de comprimento de transecção do parênquima (MCTP), expressos por médias $\pm$ desvio padrão. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	74
Tabela 3- Distribuição dos valores de diâmetro externo (DE, μ m), diâmetro interno (DI, μ m) e espessura proporcional da camada muscular média (ECM) expressos por médias $\pm$ desvio padrão. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	77

Lista de figuras

	Página
Figura 1- Imunoistoquímica para VEGF dos grupos estudados. A: Controle externo (CE); B: Controle ácido retinóico (CA); C: Placebo óleo nitrofen (ON); D: Placebo óleo ácido retinóico (OA); E: Nitrofen sem HDC (N-); F: Nitrofen com HDC (N+); G: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico (NA-); H: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico (NA+).....	79
Figura 2- Imunoistoquímica para VEGFR1 dos grupos estudados. A: Controle externo (CE); B: Controle ácido retinóico (CA); C: Placebo óleo nitrofen (ON); D: Placebo óleo ácido retinóico (OA); E: Nitrofen sem HDC (N-); F: Nitrofen com HDC (N+); G: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico (NA-); H: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico (NA+).....	80
Figura 3- Imunoistoquímica para VEGFR2 dos grupos estudados. A: Controle externo (CE); B: Controle ácido retinóico (CA); C: Placebo óleo nitrofen (ON); D: Placebo óleo ácido retinóico (OA); E: Nitrofen sem HDC (N-); F: Nitrofen com HDC (N+); G: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico (NA-); H: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico (NA+).....	81
Figura 4- Análise da expressão de VEGF por western blotting. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	82

Figura 5- Análise da expressão de VEGFR1 por Western Blotting mostrando diminuição nos fetos expostos com HDC (N+) e recuperação parcial pela administração de ácido retinóico (NA+). CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico..... 84

Figura 6- Análise da expressão de VEGFR2 por western blotting mostrando diminuição nos fetos expostos com HDC (N+) sem recuperação pela administração de ácido retinóico (NA+). CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico..... 86

Lista de gráficos

	Página
Gráfico 1- Valores das médias do peso corporal (PC) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. $*p < 0,05$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	70
Gráfico 2- Valores das médias do peso pulmonar total (PPT) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. $*p < 0,05$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	71
Gráfico 3- Valores das médias do peso do pulmão esquerdo (PPE) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. $*p < 0,001$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	72
Gráfico 4- Valores das médias da relação peso pulmonar total / peso corporal (PPT/PC) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. $*p < 0,001$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	73

Gráfico 5-	Valores das médias linear de intercepção (MLI) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. $*p<0,001$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	75
Gráfico 6-	Valores das médias de diâmetro de espaço aéreo (DEA) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. $*p<0,001$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	75
Gráfico 7-	Valores das médias de comprimento de transecção do parênquima / espaço aéreo (MCTP) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. $*p<0,001$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	76
Gráfico 8-	Valores das médias da espessura proporcional de camada média (ECM) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. $*p<0,001$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	78

Gráfico 9-	Valores das médias de densidade ótica das bandas de western blotting para VEGF. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	83
Gráfico 10-	Valores das médias de densidade ótica das bandas obtidas na análise por western blotting para VEGFR1. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	85
Gráfico 11-	Valores das médias de densidade ótica das bandas obtidas na análise por western blotting para VEGFR2. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.....	87

1. INTRODUÇÃO

A hérnia diafragmática congênita (HDC) é um defeito da embriogênese do diafragma que acomete 1:2500 nascidos vivos e constitui 8% das principais anomalias congênitas (1,2). A HDC ocorre por um defeito no fechamento da região póstero-lateral do diafragma com a passagem de órgãos abdominais para o interior do tórax. A presença dos órgãos abdominais dentro do tórax atua como uma lesão expansiva, comprime o pulmão e compromete o seu desenvolvimento resultando em um defeito da maturação e hipoplasia pulmonar (3,4,5).

A mortalidade da HDC varia de 32 a 62% (6,7). No entanto, estima-se que aproximadamente uma em 2000 concepções não chegue a termo por complicações associadas (8). As principais causas de mortalidade são a hipoplasia e a hipertensão pulmonar e, apesar dos recentes avanços na terapêutica, a mortalidade da doença permanece alta (6,8). A abordagem ideal da HDC seria a prevenção da formação do defeito ou a estimulação da maturação pulmonar *in utero*, para tanto é necessária uma melhor compreensão dos mecanismos de formação do diafragma e desenvolvimento pulmonar envolvidos na HDC (9).

Os modelos animais de HDC contribuem para a compreensão da etiologia e dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da doença e de suas complicações. O primeiro modelo experimental de HDC surgiu da observação de que aproximadamente 60% da prole de ratas deficientes em retinol desenvolve HDC, além de outras anomalias congênitas (4). Este modelo foi a evidência inicial de que um distúrbio do metabolismo do ácido retinóico poderia estar envolvido na etiologia da HDC.

Posteriormente, vários teratógenos se mostraram capazes de induzir a formação da HDC (10,11,12). Dentre eles, o mais extensamente estudado e caracterizado é o modelo que utiliza o herbicida nitrofen (2,4-dicloro-4'-nitrodifenil éter). A indução de HDC pelo nitrofen em ratos é variável de acordo com a dose administrada e a idade gestacional. Na raça Sprague-Dawley, quando administrado na dose 100 mg no nono dia de gestação (termo = 22 dias), pode-se obter de 41 a 69% dos fetos com HDC (12).

No modelo de HDC induzida pelo nitrofen em fetos de rato o momento gestacional de indução do defeito primário é semelhante ao do aparecimento do defeito em seres humanos, ou seja, no início da embriogênese (13). O fato de que neste, e em outros modelos animais, a HDC surge por um defeito na formação da membrana pleuroperitoneal, sugere que a HDC em

humanos ocorra por um defeito na mesma estrutura entre a quarta e sexta semana gestacional (14). Além da semelhança no estágio embrionário de aparecimento do defeito, uma das principais vantagens deste modelo é a semelhança anatômica e histopatológica do pulmão com a HDC em humanos, onde se encontram hipoplasia, imaturidade e alterações da microvasculatura pulmonar (13).

As semelhanças embrionárias, anatômicas e histológicas entre estes modelos levaram à hipótese de que o nitrofen alteraria a homeostase do ácido retinóico. Foi demonstrado que o nitrofen inibe, no diafragma embrionário, a atividade da enzima retinaldesidrogenase-2 (RALDH2), enzima passo-limitante da transformação do retinol proveniente da dieta materna em ácido retinóico, o qual é o composto ativo nos tecidos embrionários (15,16). Posteriormente, foi demonstrado que a administração de retinol ou ácido retinóico durante o período crítico para a formação do diafragma – do 8º ao 12º dia de gestação em ratos – diminui significativamente a frequência de HDC nos fetos expostos ao nitrofen, especialmente quando se utiliza o ácido retinóico em comparação ao retinol. Isso poderia ser explicado pelo fato de que o ácido retinóico é o próprio composto ativo na embriogênese enquanto que o retinol necessita ser convertido no tecido pela enzima RALDH2 (17,18).

O ácido retinóico é fundamental não só para a embriogênese diafragmática como também para o correto desenvolvimento pulmonar. Ele se liga a seus diferentes receptores para promover a transcrição de genes-alvo, os quais possuem um elemento responsivo ao ácido retinóico em sua região promotora, e é necessário para a formação do broto pulmonar a partir do divertículo laríngeotraqueal (19).

Durante a fase pseudoglandular do desenvolvimento pulmonar (8 a 20 semanas em humanos, 10 a 20 dias de gestação no rato) é necessária a diminuição da concentração de ácido retinóico e seus receptores, uma vez que ele inibe a ramificação pulmonar que deve ocorrer durante este período. A partir da fase sacular (24 a 40 semanas em humanos, 20 dias de gestação até 9 dias pós-natal no rato) e na fase alveolar (a partir de 32 semanas em humanos e a partir de 8 dias pós-natal em rato) é necessário um aumento na concentração do ácido retinóico. Este aumento torna-se novamente necessário para que ocorra a septação e alveolarização normais, processos gravemente comprometidos na HDC (20,21).

No modelo de HDC criada cirurgicamente em ovelhas o tratamento com ácido retinóico não alterou a morfologia pulmonar, mas aumentou a concentração de RNAm de surfactante e normalizou a relação de pneumócitos tipo I : pneumócitos tipo II (22).

As anormalidades histológicas na HDC estão bem descritas e envolvem diminuição da ramificação dos brônquios, diminuição da alveolarização e espessamento da camada muscular média das arteríolas pulmonares, a qual é diretamente proporcional ao grau de hipertensão pulmonar (23,24). No entanto, pouco é conhecido sobre as alterações moleculares que resultam nas anormalidades histológicas observadas. De especial interesse são as alterações que ocorrem em fatores de crescimento, os quais são fundamentais para o desenvolvimento pulmonar normal e devem estar implicados no desenvolvimento do pulmão na HDC.

O VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*, ou fator de crescimento vascular derivado do endotélio) é o principal fator de crescimento estimulador da vasculatura. Dentre as cinco isoformas conhecidas o VEGF-A é a principal mediadora da angiogênese. Trata-se de uma glicoproteína homodimérica de 34-46 kDa altamente específica 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 (25,26).

Seus receptores, VEGFR1 (Flt-1) e VEGFR2 (Flk-1 em ratos e KDR em humanos) possuem atividade tirosina-kinase e são responsáveis por regular a angiogênese normal e patológica (27,28). O VEGF atua via receptores VEGFR1 e VEGFR2 para promover a diferenciação e proliferação das células endoteliais e formação da vasculatura primitiva.

O VEGFR1 possui maior afinidade pelo VEGF-A, no entanto, apresenta menor atividade tirosina-kinase do que o VEGFR2 (27). Além disso, nos estágios iniciais da embriogênese o VEGFR1 tem um papel inibidor do crescimento vascular (29). O VEGFR-2 é importante para a proliferação e migração de células endoteliais, sendo expresso em células endoteliais de vasos linfáticos durante o desenvolvimento (30,31).

A via de sinalização do VEGF também é fundamental para o desenvolvimento pulmonar normal. Durante o desenvolvimento pulmonar há um aumento em sua concentração pouco antes do nascimento e permanece alto no pulmão adulto (21). Além de ser necessário para angiogênese e vascularização pulmonar, o VEGF é essencial para proliferação de células

epiteliais pulmonares e para a produção de surfactante (26). Não obstante, o desenvolvimento vascular pulmonar é um processo acoplado à alveolarização, de forma que o bloqueio da via de sinalização do VEGF leva tanto à diminuição da vascularização com hipertensão pulmonar quanto à diminuição da alveolarização (32).

A via de sinalização do VEGF é necessária não só para o desenvolvimento estrutural do pulmão fetal, mas também para a manutenção da função pulmonar. A hipóxia do tecido pulmonar induz a produção de VEGF que, por meio de seus receptores, age sobre os pneumócitos tipo 2 aumentando a produção de surfactante. Ratos com deficiência de VEGF ou que receberam aplicações de anticorpos anti-receptores de VEGF apresentam Síndrome da Angústia Respiratória (SARA), além de apresentarem hiperplasia de ventrículo direito e espessamento das arteríolas pulmonares, indicando hipertensão pulmonar (33,34,35).

Estudos sobre a expressão pulmonar de VEGF no modelo animal de HDC induzida pelo nitrofen apresentaram resultados conflitantes, mostrando ou uma diminuição da quantidade desta proteína (36,37,38) ou um aumento no conteúdo do RNAm correspondente (39). Por outro lado, a análise do conteúdo de RNAm pulmonar dos receptores VEGFR1 e VEGFR2 se mostrou similar entre fetos com e sem HDC expostos ao nitrofen (38). No entanto, a quantificação das proteínas VEGFR1 e VEGFR2 não foram avaliadas neste modelo animal.

Além disso, a transcrição do VEGF é regulada pelo ácido retinóico em diversas linhagens celulares, no entanto os resultados obtidos com administração do ácido retinóico sobre a vascularização são controversos, mostrando ora efeito pró-angiogênico, ora efeito anti-angiogênico dependendo da linhagem celular e da técnica utilizada (40).

Neste sentido, os efeitos da administração de ácido retinóico sobre a vascularização pulmonar ou a expressão de VEGF no pulmão são desconhecidos. Portanto, estudar as vias de sinalização do crescimento vascular e o possível efeito regenerador do tratamento com ácido retinóico pode contribuir para a compreensão da vascularização pulmonar normal e da HDC.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Avaliar o efeito do tratamento pré-natal com ácido retinóico no desenvolvimento pulmonar no modelo experimental de HDC induzida pelo nitrofen em ratos.

2.2 Específicos

2.2.1- Avaliar o efeito do tratamento com ácido retinóico no crescimento e maturação pulmonares por meio de medidas morfométricas.

2.2.2- Avaliar o efeito do tratamento com ácido retinóico na muscularização das arteríolas pulmonares.

2.2.3- Avaliar o efeito do tratamento com ácido retinóico na expressão de VEGF e dos receptores VEGFR1 e VEGFR2 por meio de imunohistoquímica e western blotting.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1- Avaliação do Comitê de Ética em Experimentação Animal

O experimento foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA-UNICAMP) como projeto de pesquisa número 935-1.

3.2- Animais e obtenção de fêmeas prenhes

Ratos machos e fêmeas Sprague-Dawley adultos provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB - UNICAMP, Campinas) foram submetidos ao acasalamento durante o período escuro do ciclo. No dia seguinte, a região genital da fêmea foi examinada para verificação da mancha vaginal de esperma e foi realizado esfregaço vaginal para observação de espermatozóides. A presença de espermatozóides configurou o acasalamento e foi considerado o dia zero de prenhez (o tempo de gestação normal de ratas até o termo é de 22 dias). Os animais foram mantidos em gaiolas com oferecimento de água e ração para roedores *ad libitum*, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro, temperatura (média de 23 °C) e umidade relativa do ar (média de 55%).

3.3- Formação dos grupos experimentais

As ratas prenhes foram divididas em seis grupos experimentais, os quais deram origem a oito subgrupos fetais:

1. Grupo Controle Externo (CE): Ratas prenhes não manipuladas (n=25 fetos).
2. Grupo Placebo Óleo de Oliva Nitrofen (ON) (n=25 fetos): Ratas prenhes receberam 1 ml de azeite de oliva via oral (gavagem) no dia gestacional 9,5.
3. Grupo Placebo Óleo de Oliva Ácido Retinóico (OA) (n=25 fetos): Ratas prenhes receberam 1 ml azeite de oliva via intraperitoneal nos dias gestacionais 18,5, 19,5, e 20,5.
4. Grupo Nitrofen: Ratas prenhes receberam 100 mg de Nitrofen diluído em 1 ml de óleo de oliva por via oral (gavagem) no dia gestacional 9,5. Os fetos foram divididos em dois subgrupos de acordo com a presença de HDC:
 - a. Grupo Nitrofen sem HDC (N-) (n=25 fetos): Fetos de ratas prenhes expostos ao Nitrofen sem HDC.

b. Grupo Nitrofen com HDC (N+) (n=25 fetos): Fetos de ratas prenhes expostas ao Nitrofen com HDC à esquerda. Foram excluídos do estudo os fetos com defeitos do diafragma à direita ou bilaterais.

5. Grupo Controle Ácido Retinóico (CA) (n=25 fetos): Ratas prenhes receberam 5 mg/kg de ácido retinóico diluído em 1 ml de óleo de oliva nos dias gestacionais 18,5, 19,5, e 20,5.

6. Grupo Nitrofen + Ácido Retinóico: Ratas prenhes receberam 100 mg de Nitrofen diluído em 1 ml de óleo de oliva por via oral (gavagem) no dia gestacional 9,5 e 5 mg/kg de ácido retinóico diluído em 1 ml de óleo de oliva nos dias gestacionais 18,5, 19,5, e 20,5. Os fetos foram divididos em dois subgrupos de acordo com a presença de HDC:

a. Grupo Nitrofen + Ácido Retinóico sem HDC (NA-) (n=25 fetos): Fetos de ratas prenhes expostos ao Nitrofen sem HDC.

b. Grupo Nitrofen + Ácido Retinóico com HDC (NA+) (n=25 fetos): Fetos de ratas prenhes expostas ao Nitrofen com HDC à esquerda. Foram excluídos do estudo os fetos com defeitos do diafragma à direita ou bilaterais.

3.4- Coleta das amostras

No dia gestacional 21,5, as ratas foram anestesiadas com injeção intramuscular de 0,56 mL de ketamina base – 50 mg/mL (Ketamina® - Pfizer do Brasil) associada a 0,04 mL de xilazina 10 mg/mL (Rompum® - Bayer do Brasil) por animal, aplicada na musculatura lateral da coxa com seringa de insulina e agulha calibre 20G. Depois de anestesiadas as ratas foram submetidas à laparotomia, seguida de secção da musculatura uterina e membranas coriônica e amniótica. Os fetos foram removidos do útero e pesado em balança, modelo OHAUS 360 (Denver Instruments, Denver, CO). Após a pesagem, os fetos foram sacrificados por meio de punção occipital com agulha 20G e em seguida foram colocados em mesa de cortiça e fixados com alfinetes.

3.5- Análise morfológica do diafragma e do pulmão

Os fetos dos grupos CE, ON, OA e CA tiveram o abdome e tórax aberto: os pulmões foram removidos e pesados. Os fetos expostos ao 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, caracterizada por um orifício na parede posterior do tórax, e tiveram os pulmões removidos. Pulmões com ou sem hérnia diafragmática foram acondicionados para estudo. Foram aferidas as seguintes variáveis: peso corporal (PC), peso do pulmão total (PPT) e peso do pulmão esquerdo (PPE), em seguida foi calculada a relação PPT/PC. Para análise macroscópica foram utilizados 25 fetos por grupo.

3.6- Processamento para análise morfométrica e imunoistoquímica

Os pulmões esquerdos destinados à análise morfométrica e imunoistoquímica foram fixados em solução de formaldeído 10%. Após fixação, as amostras foram desidratadas em um gradiente crescente de etanol, 70 %, 80 %, 90 % e 100 %, respectivamente, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo Leica – Modelo RM 2145, no sentido longitudinal, com espessura de 5 µm e colocados em lâminas histológicas tratadas com poli-L-lisina para aderência. Para análise morfométrica os cortes foram corados por Hematoxilina de Erlich / Eosina (H/E) e as lâminas foram montadas em Entellan®.

3.7- Análise da morfometria pulmonar

Utilizando-se um microscópio de luz, os cortes histológicos corados com H/E foram analisados qualitativamente em diferentes aumentos para estabelecer-se as principais diferenças morfológicas, sobretudo com relação à espessura dos septos alveolares. Os seguintes parâmetros de morfometria foram estudados de acordo com os métodos descritos por Dunill (1962) modificados por Verbeken et al. (1992): média linear de interceptação (MLI) e seus componentes diâmetro interno dos espaços aéreos (DEA) e a relação de comprimento de transecção do parênquima / espaço aéreo (MCTP) e (41,42).

Cortes histológicos corados em H/E foram fotografados em aumento de 100X em fotomicroscópio e analisados no software Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics). A análise morfométrica foi realizada utilizando seis cortes histológicos por feto de cinco fetos por grupo.

Aferição da MLI foi feita pela projeção de duas linhas perpendiculares no campo pulmonar em magnificação de 100X. A MLI foi obtida pela contagem do número de

interseções (NI) entre cada linha e os septos alveolares dividido pelo comprimento da linha. Para aferição da MCTP e do DEA as linhas utilizadas para aferição da ML foram divididas em 100 segmentos de mesmo comprimento. A soma dos segmentos sobre o espaço aéreo é a DEA. A MCTP foi obtida pela soma de segmentos sobre o parênquima dividido pelo NI.

3.8- Análise da morfometria vascular

Para estudo da muscularização arteriolar foram utilizados cortes histológicos de 5µm corados com H/E fotografados em aumento de 200X em fotomicroscópio Nikon. Foram estudados somente arteríolas de 30 a 60 µm, ou seja, arteríolas pré-acinares de resistência. Foram analisados 40 vasos por grupo provenientes de cinco fetos em campos aleatórios. Os parâmetros morfométricos vasculares analisados foram: diâmetro externo (DE, µm) e diâmetro interno (DI, µm), a partir dos quais foi calculada a espessura proporcional da camada muscular média (ECM), através do cálculo: $EC = (DE - DI) / DE$. Por se tratar de uma proporção, esta variável anula os efeitos de vasodilatação ou constrição e de fixação do material sobre as medidas morfométricas (43). As imagens foram analisadas no software Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics).

3.9- Imunoistoquímica para VEGF e receptores VEGFR1 E VEGFR2

Cortes histológicos obtidos em parafina foram tratados com desparafinizados em xilol e re-hidratados em série decrescente de etanol. Em seguida, os cortes foram incubados em borato de sódio 0,1M em PBS 0,01M (pH 7,4) por uma hora em temperatura ambiente para exposição dos epítomos. Posteriormente os cortes foram separados e foram com peróxido de hidrogênio a 10% em PBS 0,01M (pH 7,4) por 30 minutos, visando eliminar as peroxidases endógenas, seguido pela incubação com albumina bovina sérica (BSA) a 1% em PBS por uma hora. Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados a 4°C por 12 horas com o anticorpo primário anti-VEGF (sc-7269, Santa Cruz Biotechnology, California), anti-VEGFR1 (sc-316, Santa Cruz Biotechnology, California) ou anti-VEGFR2 (sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, California) diluídos 1:100, 1:100 e 1:50, respectivamente em PBS/BSA 1%. Com o término desta etapa os cortes foram lavados em PBS e incubados em anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-mouse feito em cabra (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, California)

diluído 1:100 em PBS/BSA 1% se incubados com anticorpo anti-VEGF e anti-VEGFR2 ou anti-rabbit feito em cabra (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, California) diluído em 1:200 PBS/BSA 1% se incubados com anticorpo anti-VEGFR1, ambos por uma hora. Após a incubação os cortes foram lavados em TBS 0,05M pH 7,4 e tratados com avidina-biotina (Vectastain ABC kit, Vector Labs, California) diluído 1:20 em TBS 0,05M pH 7,4 por 45 minutos. A revelação foi realizada com solução de tetrahidrocloreto de diaminobenzidina 0,01% (Sigma Aldrich) e peróxido de hidrogênio 0,03% em TBS 0,05M pH 7,4 por 25 minutos. Em seguida os cortes foram lavados contra corados com Hematoxilina de Harris, desidratados e montados com Entellan®.

3.10- Análise semiquantitativa da imunoistoquímica

Foram analisados três cortes por feto de três fetos por grupo. Os cortes histológicos que receberam tratamento imunoistoquímico, foram analisados em microscópio de luz em magnificação de 200X quanto à intensidade da marcação. De acordo com a intensidade foi feita pontuação de 0 a 4, sendo 0 = negativo, 1 = marcação fraca, 2 = marcação moderada, 3 = marcação forte e 4 = marcação muito forte. As lâminas foram analisadas por dois avaliadores cegos e independentes.

3.11- Análise por Western Blotting

Foram utilizados seis fetos por grupo para a análise por western blotting, a qual foi avaliada semiquantitativamente pela intensidade das bandas obtidas. Os pulmões coletados foram homogenizados em tampão de extração contendo: Tris 100 mM (pH 7.4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil 2 mM, 0,1 mg de aprotinina e Triton-X100 1% a 4°C homogenizador para pequenas amostras TE-103 (Tecnal, Paulínia) a 30000 rpm por 30s. Em seguida as amostras foram centrifugadas em centrífuga Mikro 200R (Hettich, Alemanha) a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -80°C. Posteriormente a concentração de proteínas de cada amostra foi aferida pelo método de Bradford (44).

Para a análise por western blotting, um volume de amostra contendo 120 µg de proteína de cada grupo foi diluídas com 12 µl de tampão de Laemmli (0.0625 M de Tris-HCl,

pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0.001% de azul de bromofenol e 5% de 2-mercaptoetanol) e fervidas durante 5 minutos. Após rápida centrifugação a 10.000 g (30 s), as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 8% contendo 0.1% de lauril sulfato de sódio (SDS - PAGE) e tampão de corrida. A composição do tampão utilizado na corrida eletroforética foi: Tris (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0.1%) ajustado para pH 8,3. A separação eletroforética das proteínas foi realizada com uma intensidade de corrente constante (100V), durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência a 120V durante 90 minutos. A composição do tampão empregado para a transferência eletroforética das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi: Tris (25 mM), glicina (192 mM), SDS (0.1%) e metanol (20%).

Para comprovar a transferência, os géis foram corados com corante azul de Commassie (solução à 0.1% em solução aquosa de ácido acético 5% contendo 25% de etanol). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados por incubação da mesma em solução a 0,2% de albumina bovina sérica em tampão PBS 0,01M pH7,4 sob agitação constante durante uma hora. A seguir, as membranas foram incubadas durante 12 horas a 4°C com os anticorpos primários anti-VEGF (sc-7269, Santa Cruz Biotechnology, California), anti-VEGFR1 (sc-316, Santa Cruz Biotechnology, California) ou anti-VEGFR2 (sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, California) diluídos 1:200, 1:200 e 1:100, respectivamente em PBS/BSA 3%.

Após o término da incubação, as membranas foram lavadas com tampão PBS 0,01M pH7,4 e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-mouse feito em cabra (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, California) diluído 1:1000 em PBS/BSA 3% se incubados com anticorpo anti-VEGF e anti-VEGFR2 ou anti-rabbit feito em cabra (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, California) diluído em 1:5000 PBS/BSA 3% se incubados com anticorpo anti-VEGFR1, ambos por duas horas. Em seguida, as membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens e foi adicionado kit de Quimioluminescência (Pierce, EUA) por 5 minutos. As membranas foram expostas a filmes radiográficos (Kodak, EUA) por 15 minutos, os quais foram revelados.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos através das pesagens foram avaliados pelo método ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer e expressos em média $\pm$ desvio-padrão. Os resultados obtidos pela avaliação da intensidade da marcação imunoistoquímica foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Foram consideradas significativas diferenças para $p < 0,05$. Os cálculos foram feitos por meio do programa GraphPad Prism 3.02.

5. RESULTADO

O total de 200 fetos provenientes de 21 ratas prenhes foi analisado. A administração de nitrofen por gavagem ou de ácido retinóico por via intraperitoneal não resultou em complicações maternas e não houve mortalidade materna. Nos fetos expostos ao nitrofen foi observada frequência de 40% de HDC.

5.1- Análise macroscópica

Fetos expostos ao nitrofen sem ou com HDC – grupos N-, N+, NA- e NA+ – apresentaram diminuição do PC em relação aos grupos CE, ON, OA e CA ($p < 0,05$). Dentre os fetos expostos ao nitrofen a presença de HDC não alterou o PC, sendo o esta variável semelhante entre os grupos N- e N+. A administração de ácido retinóico também não alterou o PC em fetos não expostos ou expostos ao nitrofen sem e com HDC (Tabela 1, Gráfico 1).

Tabela 1- Distribuição dos valores de peso corporal (PC), peso pulmonar total (PPT), peso do pulmão esquerdo (PPE) e relação PPT/PC, em mg, expressos por médias $\pm$ desvio padrão. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

	PC	PPT	PPE	PPT/PC
CE	6003 $\pm$ 950	131 $\pm$ 24	44 $\pm$ 7,7	0,0221 $\pm$ 0,0037
ON	6039 $\pm$ 442	159 $\pm$ 23	54 $\pm$ 8,1	0,0265 $\pm$ 0,0025
OA	6201 $\pm$ 395	160 $\pm$ 22	50 $\pm$ 5,9	0,0248 $\pm$ 0,0021
CA	6230 $\pm$ 910	151 $\pm$ 27	49 $\pm$ 7,6	0,0241 $\pm$ 0,0022
N-	5423 $\pm$ 373	104 $\pm$ 17	37 $\pm$ 5,7	0,0195 $\pm$ 0,0031
N+	5526 $\pm$ 467	84 $\pm$ 12	25 $\pm$ 6,1	0,0153 $\pm$ 0,0020
NA-	5040 $\pm$ 342	103 $\pm$ 21	36 $\pm$ 6,6	0,0203 $\pm$ 0,0033
NA+	5010 $\pm$ 378	73 $\pm$ 12	23 $\pm$ 4,1	0,0145 $\pm$ 0,0020

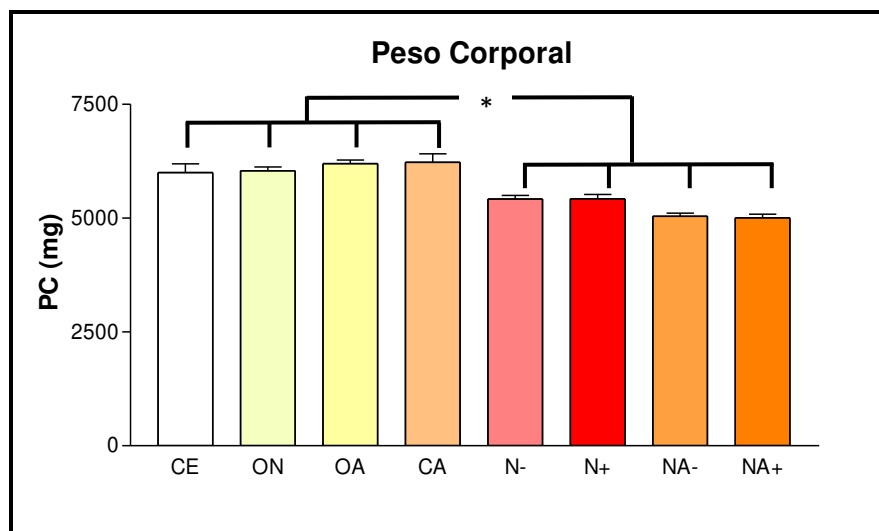


Gráfico 1- Valores das médias do peso corporal (PC) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. $*p < 0,05$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

Fetos expostos ao nitrofen sem ou com HDC – grupos N-, N+, NA- e NA+ – apresentaram diminuição do PPT em relação aos grupos CE, ON, OA e CA ($p<0,001$). Dentre os fetos expostos ao nitrofen, os fetos com HDC – grupos N+ e NA+ – apresentaram diminuição significativa do PPT em relação aos fetos sem HDC – grupos N- e NA- ($p<0,05$). A administração de ácido retinóico não alterou o PPT, sendo esta variável semelhante no grupo CA em relação aos grupos CE, ON e OA, no grupo N- em relação ao grupo NA- e no grupo N+ em relação ao grupo NA+ ($p<0,05$) (Tabela 1, Gráfico 2).

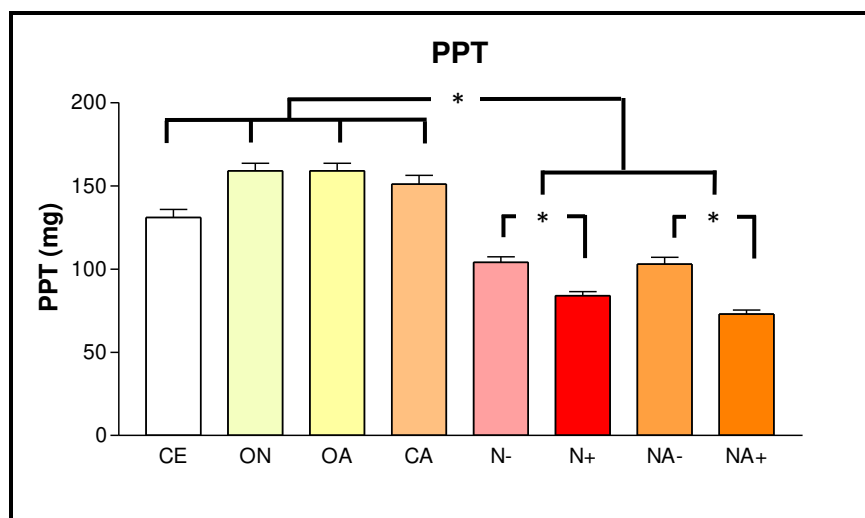


Gráfico 2- Valores das médias do peso pulmonar total (PPT) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. * $p<0,05$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

Semelhante ao observado para o PPT, fetos expostos ao nitrofen sem ou com HDC apresentaram diminuição do PPE em relação aos grupos CE, ON, OA e CA ($p<0,001$). Dentre os fetos expostos ao nitrofen, os fetos com HDC apresentaram diminuição significativa do PPE em relação aos fetos sem HDC ($p<0,001$). A administração de ácido retinóico não alterou o PPE, sendo esta variável semelhante no grupo CA em relação aos grupos CE, ON e OA. Os grupos N- e NA- apresentaram PPT semelhante e ambos maiores do que dos grupos N+ e NA+ ($p<0,001$) (Tabela 1, Gráfico 3).

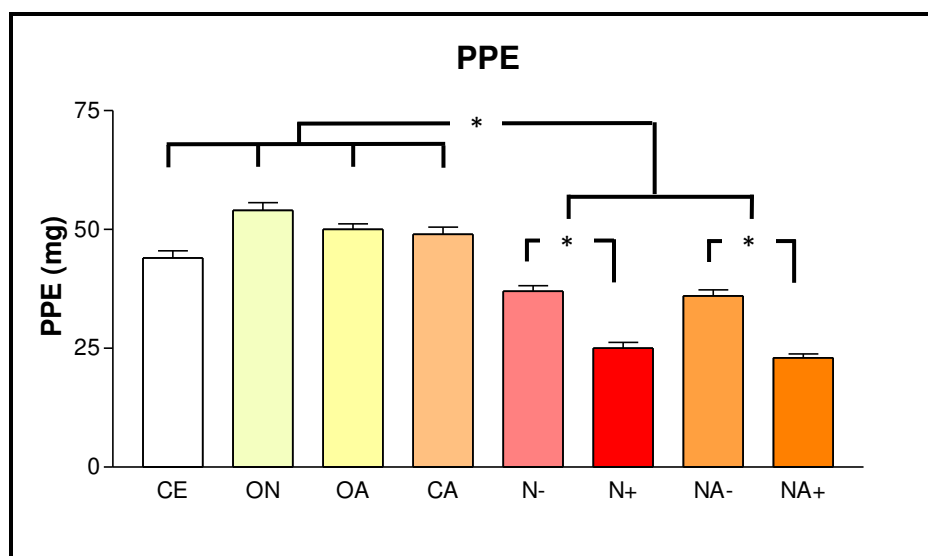


Gráfico 3- Valores das médias do peso do pulmão esquerdo (PPE) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. * $p<0,001$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

Quanto à relação PPT/PC, fetos expostos ao nitrofen sem ou com HDC apresentaram diminuição desta em relação aos grupos CE, ON, OA e CA ($p<0,001$). Dentre os fetos expostos ao nitrofen, os fetos com HDC apresentaram diminuição significativa da relação PPT/PC em relação aos fetos sem HDC ($p<0,001$). O tratamento pré-natal com ácido retinóico não alterou a relação PPT/PC, sendo esta variável semelhante no grupo CA em relação aos grupos CE, ON e OA. Também não houve influência do tratamento pré-natal com ácido retinóico sobre a relação PPT/PC entre os fetos expostos ao nitrofen, de forma que os grupos N- e NA- apresentaram PPT semelhante e ambos maiores do que dos grupos N+ e NA+ ($p<0,001$) (Tabela 1, Gráfico 4).

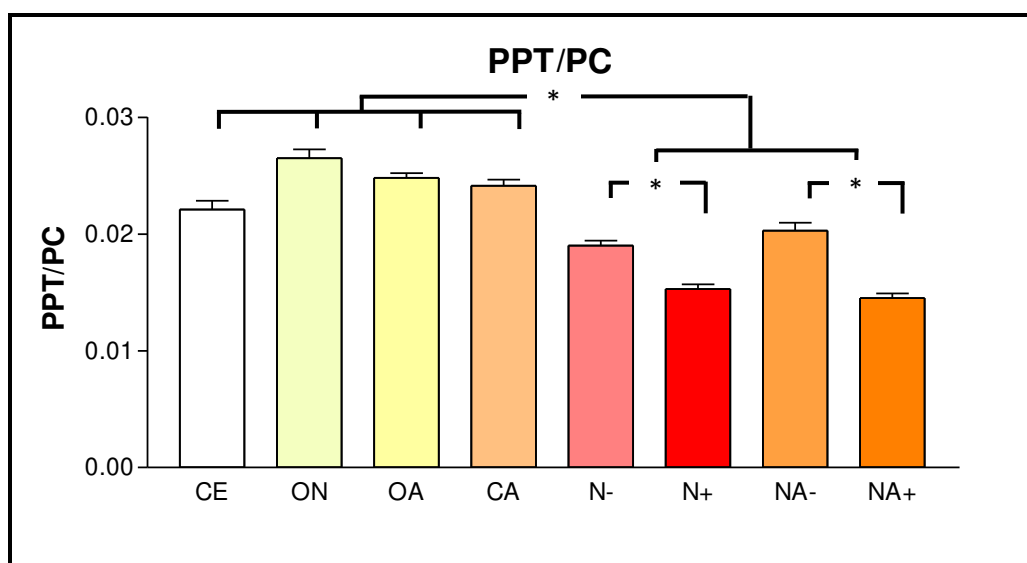


Gráfico 4- Valores das médias da relação peso pulmonar total / peso corporal (PPT/PC) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. $*p<0,001$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

5.2- Análise da morfometria pulmonar

Não houve diferença significativa da MLI ou da DEA entre os grupos CE, ON, OA, CA, N- e NA-. Somente a presença de HDC alterou significativamente estas variáveis, de forma que a MLI foi maior nos grupos N+ e NA+ em relação aos demais grupos ($p<0,001$) e a DEA foi menor nos grupos N+ e NA+ em relação aos demais grupos ($p<0,001$). Não houve diferença significativa na MLI ou DEA entre os grupos N+ e NA+ (Gráficos 5 e 6, Tabela 2).

Tabela 2- Distribuição dos valores de média linear de interceptação (MLI), diâmetro de espaço aéreo (DEA), média de comprimento de transecção do parênquima (MCTP), expressos por médias $\pm$ desvio padrão. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

	MLI	DEA	MCTP
CE	87,7 $\pm$ 22,62	24,7 $\pm$ 6,46	62,9 $\pm$ 20,16
ON	92,9 $\pm$ 15,30	27,5 $\pm$ 14,29	64,5 $\pm$ 13,58
OA	87,2 $\pm$ 15,80	23,9 $\pm$ 10,68	63,3 $\pm$ 11,58
CA	76,2 $\pm$ 14,03	25,1 $\pm$ 8,29	51,1 $\pm$ 10,66
N-	87,4 $\pm$ 19,70	21,3 $\pm$ 5,97	66,1 $\pm$ 20,19
N+	135,5 $\pm$ 66,70	18,5 $\pm$ 6,93	117,1 $\pm$ 66,7
NA-	94,1 $\pm$ 21,97	22,1 $\pm$ 5,80	73,4 $\pm$ 21,29
NA+	147,6 $\pm$ 67,3	15,0 $\pm$ 3,99	132,6 $\pm$ 66,58

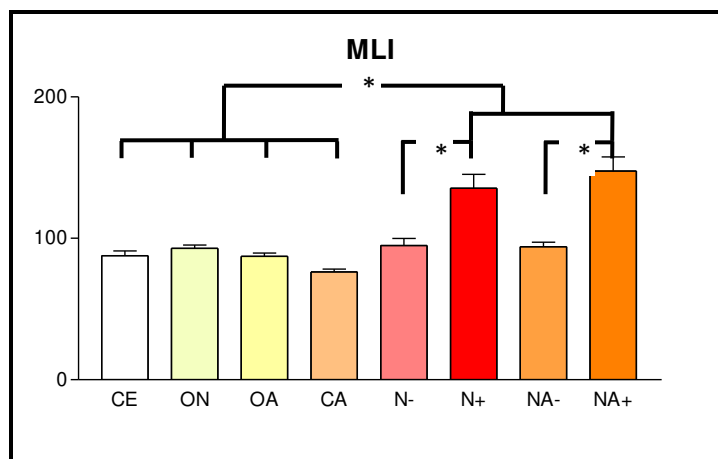


Gráfico 5- Valores das médias da média linear de interceptação (MLI) com desvio-padrão e diferença estatística. * $p < 0,001$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo nitrofen; OA: Placebo óleo ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

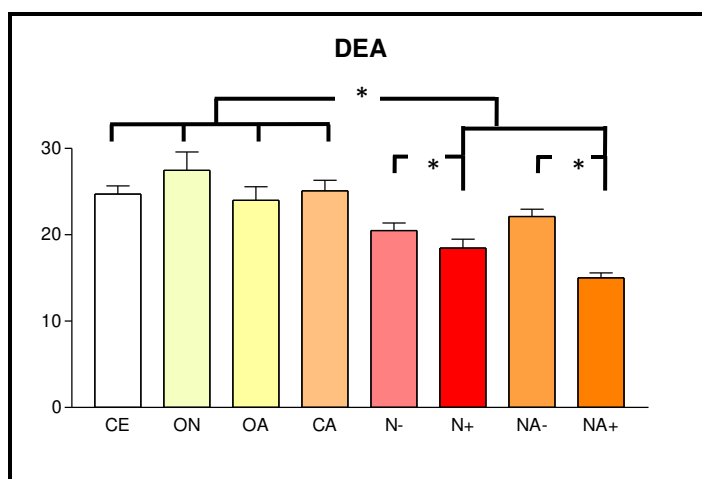


Gráfico 6- Valores das médias de diâmetro de espaço aéreo (DEA) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. * $p < 0,001$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

Da mesma forma, a análise da MCTP, a qual reflete a espessura dos septos, foi semelhante entre os grupos CE, ON, OA, CA, N- e NA-. Os fetos expostos ao nitrofen com HDC – grupos N+ e NA+ – apresentaram aumento significativo desta variável, mesmo em relação aos grupos N- e NA- ($p<0,001$). O tratamento com ácido retinóico não alterou significativamente esta variável (Gráfico 7, Tabela 2).

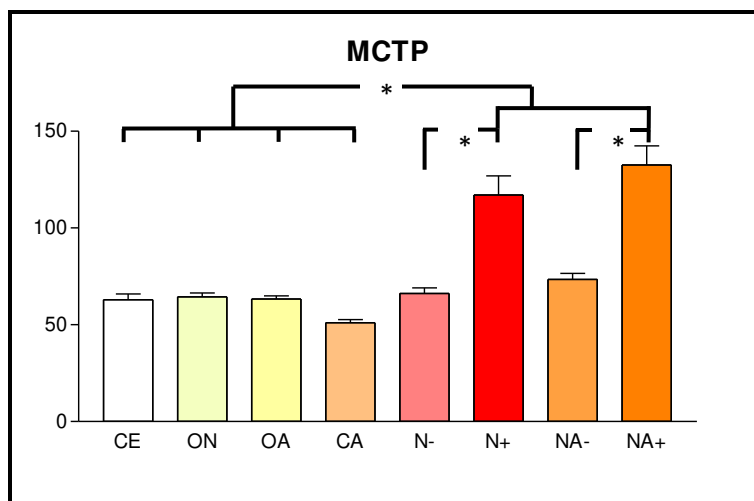


Gráfico 7- Valores das médias de comprimento de transecção do parênquima / espaço aéreo (MCTP) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. $*p<0,001$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

5.3- Análise da morfometria vascular

Fetos expostos ao nitrofen com HDC apresentaram aumento significativo da ECM em relação aos grupos CE, ON, OA, CA e N- ($p<0,001$), significando espessamento da camada muscular média naqueles grupos. Fetos expostos ao nitrofen sem HDC – grupo N- – apresentaram ECM semelhante aos grupos CE, ON e OA, porém maior que o grupo CA ($p<0,05$). O tratamento pré-natal com ácido retinóico reduziu a ECM em fetos com HDC em

relação aos fetos não tratados ($p < 0,001$). A ECM do grupo NA+ foi estatisticamente semelhante às dos grupos CE, ON, OA, CA, N- e NA- (Tabela 3, Gráfico 8).

Tabela 3- Distribuição dos valores de diâmetro externo (DE, μm), diâmetro interno (DI, μm) e espessura proporcional da camada muscular média (ECM) expressos por médias $\pm$ desvio padrão. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

	DE	DI	ECM
CE	40,45 $\pm$ 9,68	22,56 $\pm$ 9,73	0,4506 $\pm$ 0,1537
ON	39,34 $\pm$ 8,32	22,43 $\pm$ 7,42	0,4363 $\pm$ 0,0999
OA	38,26 $\pm$ 7,19	20,79 $\pm$ 4,78	0,4542 $\pm$ 0,0917
CA	37,54 $\pm$ 8,87	22,57 $\pm$ 7,26	0,3998 $\pm$ 0,1229
N-	43,58 $\pm$ 8,29	22,51 $\pm$ 6,06	0,4822 $\pm$ 0,1030
N+	42,39 $\pm$ 7,54	17,48 $\pm$ 5,37	0,5921 $\pm$ 0,0830
NA-	39,30 $\pm$ 7,75	21,76 $\pm$ 6,86	0,4518 $\pm$ 0,1062
NA+	39,72 $\pm$ 10,71	21,30 $\pm$ 8,35	0,4738 $\pm$ 0,0994

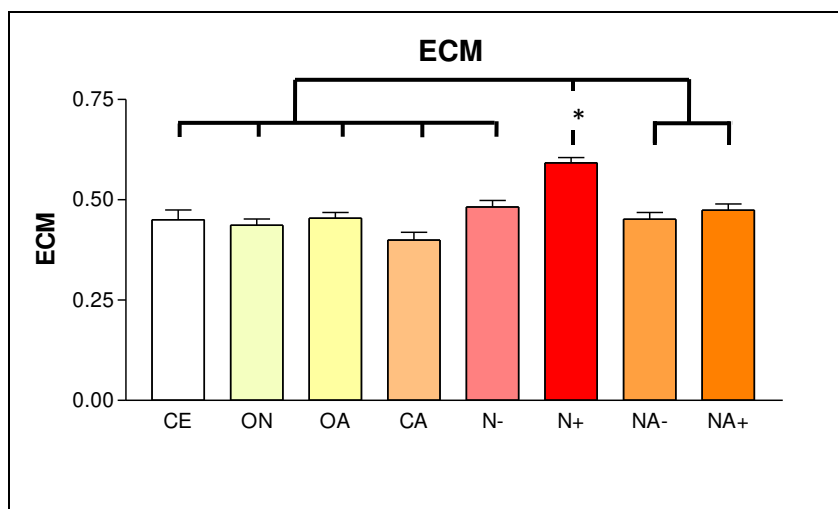


Gráfico 8- Valores das médias da espessura proporcional de camada média (ECM) dos grupos estudados com desvio-padrão e diferença estatística. $*p < 0,001$. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico

5.4- Imunoistoquímica

Na avaliação da expressão de VEGF por imunoistoquímica, fetos expostos ao nitrofen com HDC apresentaram diminuição significativa da imunomarcção em relação aos grupos CE, CA, ON, AO e N ($p < 0,05$). A administração de ácido retinóico em fetos não expostos ao nitrofen – grupo CA – não alterou a imunomarcção para VEGF. No entanto, fetos expostos ao nitrofen com HDC tratados com ácido retinóico – grupo NA+ – apresentaram aumento da imunomarcção em relação aos fetos não tratados ($p < 0,001$) (Figura 1).

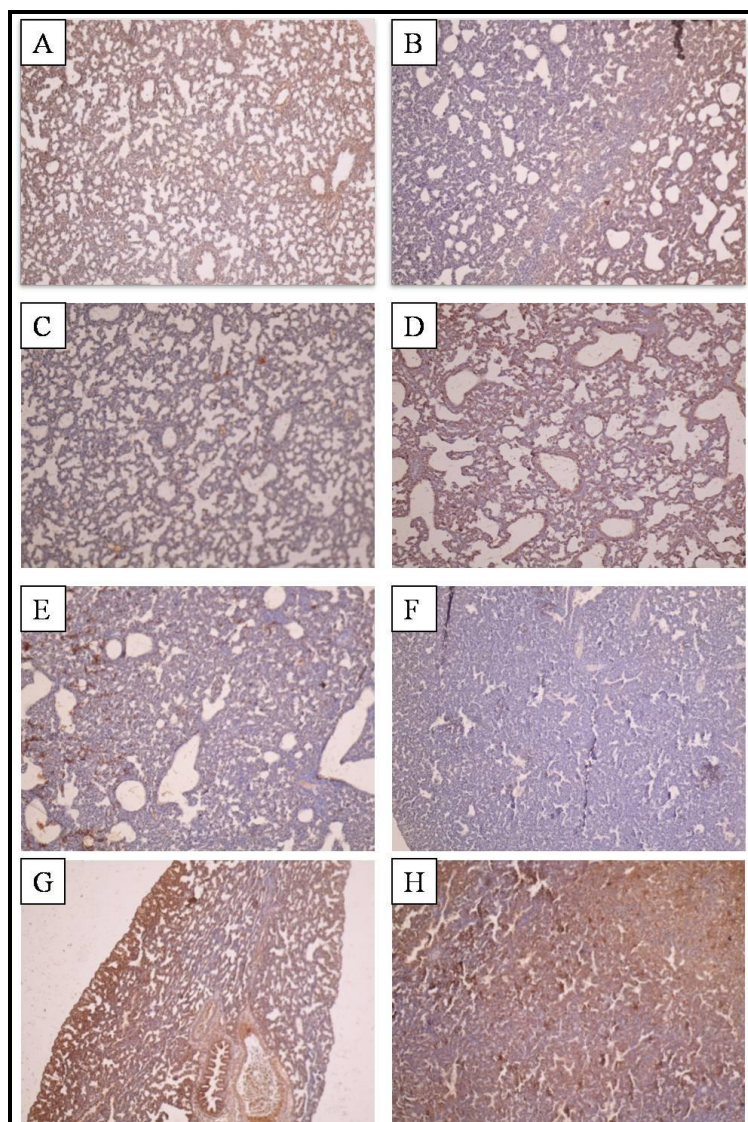


Figura 1- Imunoistoquímica para VEGF dos grupos estudados. A: Controle externo (CE); B: Controle ácido retinóico (CA); C: Placebo óleo nitrofen (ON); D: Placebo óleo ácido retinóico (OA); E: Nitrofen sem HDC (N-); F: Nitrofen com HDC (N+); G: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico (NA-); H: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico (NA+).

Da mesma forma, na avaliação da expressão de VEGFR2 por imunoistoquímica, fetos expostos ao nitrofen com HDC apresentaram expressão de VEGFR1 diminuída em

relação aos grupos CE, CA, ON, AO e N- ($p<0,05$). O tratamento pré-natal com ácido retinóico nos fetos expostos ao nitrofen com HDC – grupo NA+ – aumentou a imunomarcagem de VEGFR1 em relação aos fetos expostos ao nitrofen com HDC não tratados ($p<0,001$) (Figura 2).

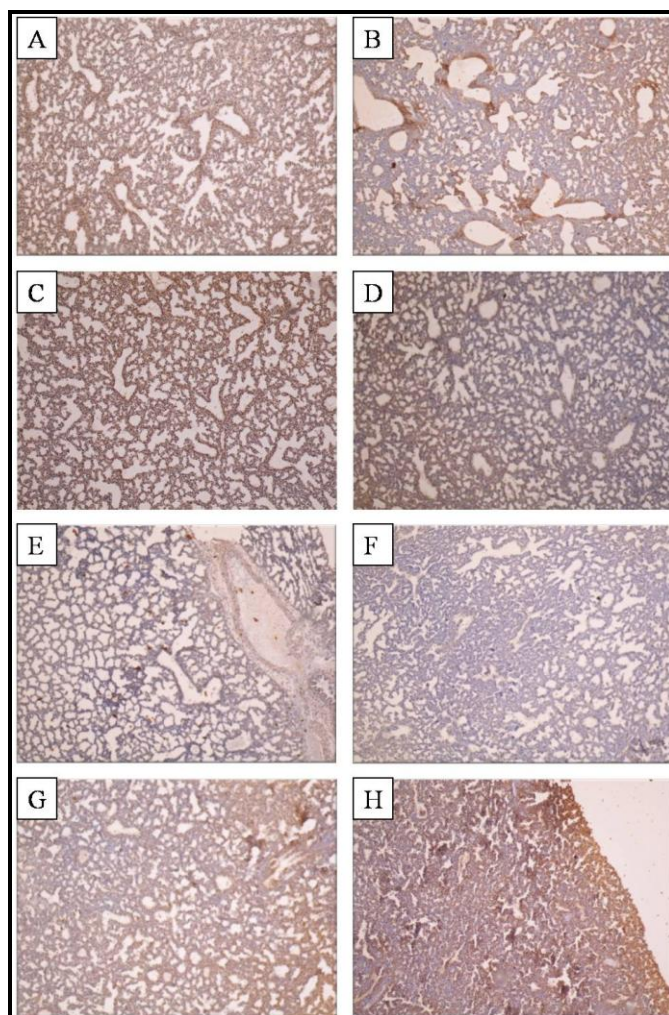


Figura 2- Imunoistoquímica para VEGFR1 dos grupos estudados. A: Controle externo (CE); B: Controle ácido retinóico (CA); C: Placebo óleo nitrofen (ON); D: Placebo óleo ácido retinóico (OA); E: Nitrofen sem HDC (N-); F: Nitrofen com HDC (N+); G: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico (NA-); H: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico (NA+).

Os resultados da imunomarcção para VEGFR2 foram semelhantes às observadas para VEGFR1. Fetos expostos ao nitrofen com HDC apresentaram diminuição da imunomarcção para VEGFR2 em relação aos grupos CE, CA, ON, AO e N- ($p<0,05$). A administração de ácido retinóico aumentou a expressão de VEGFR1 nos fetos expostos ao nitrofen com HDC – grupo NA+ – comparados aos fetos expostos ao nitrofen com HDC que não receberam o tratamento ($p<0,001$) (Figura 3).

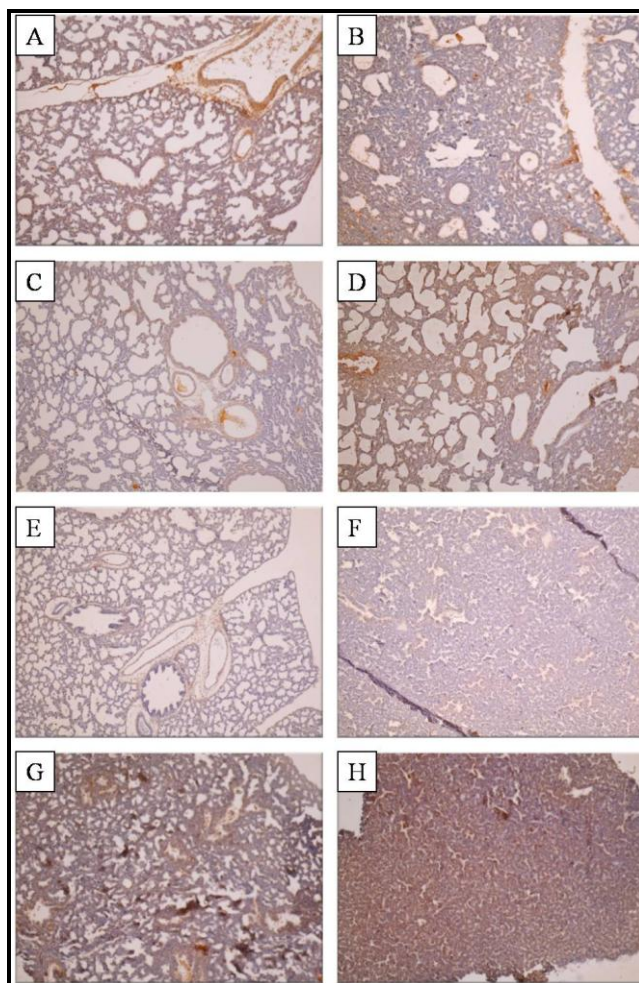


Figura 3- Imunoistoquímica para VEGFR2 dos grupos estudados. A: Controle externo (CE); B: Controle ácido retinóico (CA); C: Placebo óleo nitrofen (ON); D: Placebo óleo ácido retinóico (OA); E: Nitrofen sem HDC (N-); F: Nitrofen com HDC (N+); G: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico (NA-); H: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico (NA+).

5.5- Análise por Western Blotting

Na análise da expressão de VEGF por western blotting observamos diminuição da expressão do fator de crescimento nos fetos com HDC – grupo N+ - comparado aos demais grupos. O tratamento com ácido retinóico recuperou a expressão desta proteína nos animais com HDC, mas não alterou nos animais expostos ao nitrofen sem HDC – grupo N- (Figura 4, Gráfico 9).

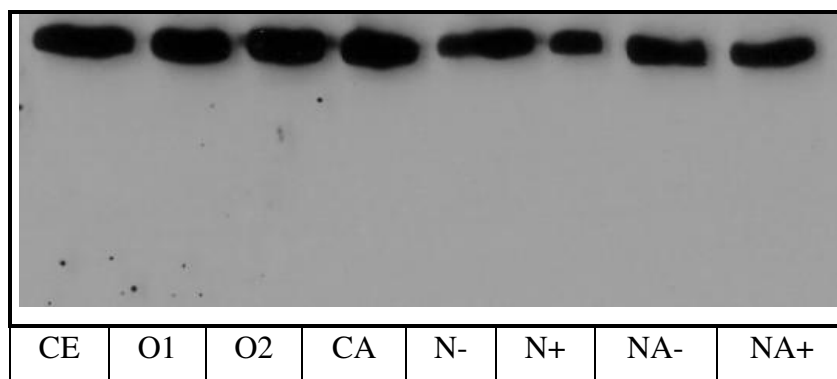


Figura 4- Análise da expressão de VEGF por Western Blotting. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

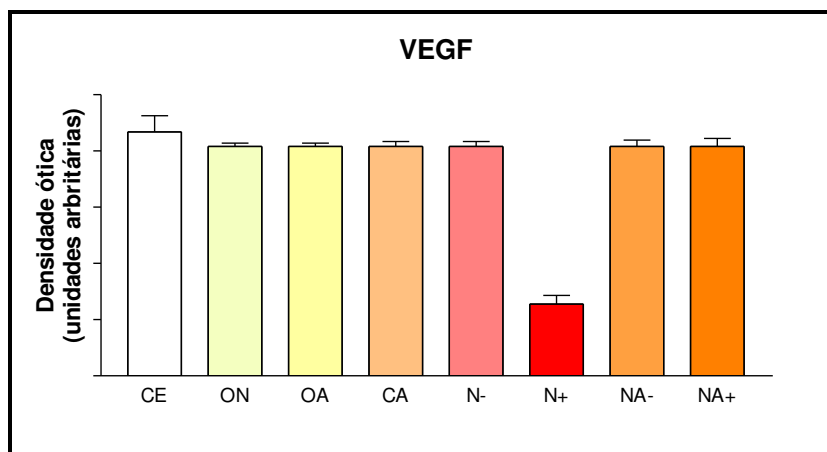


Gráfico 9- Valores das médias de densidade ótica das bandas de western blotting para VEGF.

CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

Foi observada diminuição da expressão de VEGFR1 no pulmão esquerdo de fetos expostos com HDC. A diminuição da expressão do receptor VEGFR1 foi parcialmente recuperada pelo tratamento pré-natal com ácido retinóico, tanto nos fetos sem HDC como nos fetos com HDC (Figura 5, Gráfico 10).

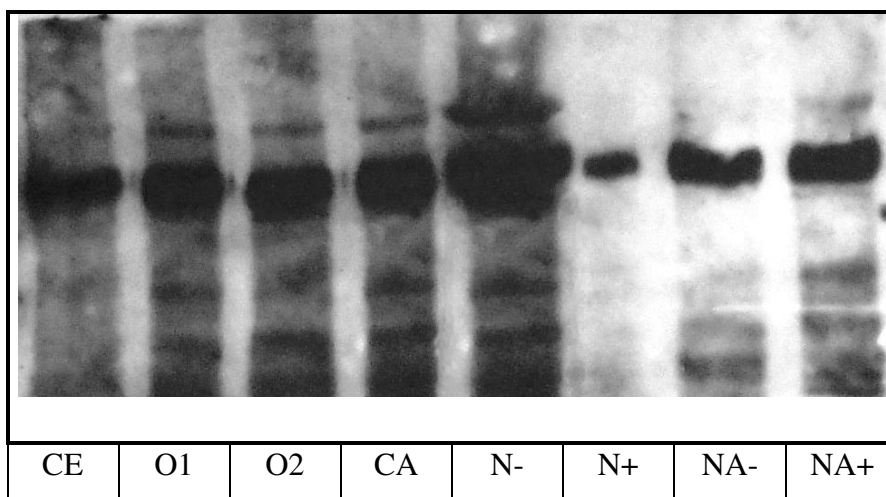


Figura 5- Análise da expressão de VEGFR1 por Western Blotting mostrando diminuição nos fetos expostos com HDC (N+) e recuperação parcial pela administração de ácido retinóico (NA+). CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

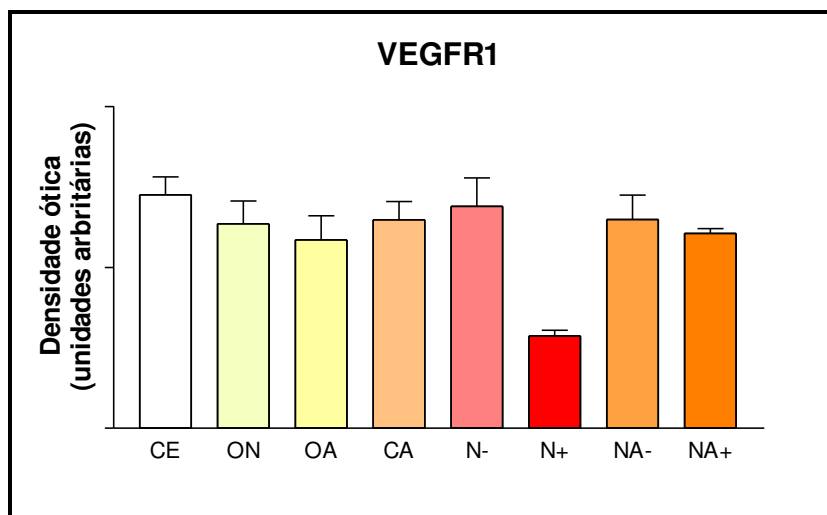


Gráfico 10- Valores das médias de densidade ótica das bandas obtidas na análise por western blotting para VEGFR1. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

Da mesma forma, fetos com HDC apresentaram diminuição da expressão de VEGFR2. No entanto, na análise por western blotting, o tratamento pré-natal com ácido retinóico não recuperou a expressão de VEGFR2 (Figura 6, Gráfico 11).

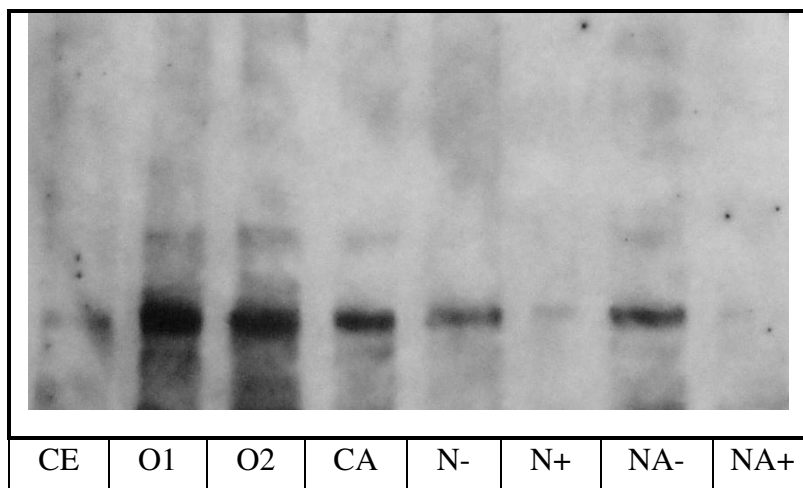


Figura 6- Análise da expressão de VEGFR2 por Western Blotting mostrando diminuição nos fetos expostos com HDC (N+) sem recuperação pela administração de ácido retinóico (NA+). CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

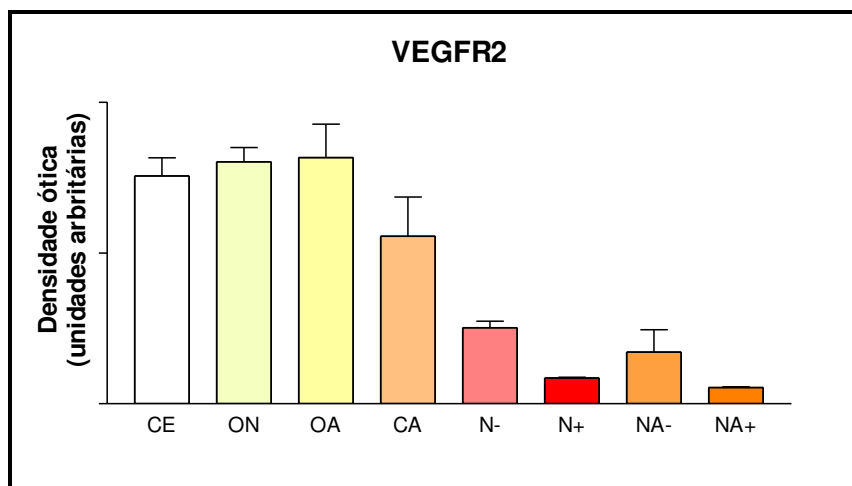


Gráfico 11- Valores das médias de densidade ótica das bandas obtidas na análise por western blotting para VEGFR2. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico.

6. DISCUSSÃO

A HDC é uma doença congênita potencialmente fatal, de difícil manejo clínico e alto custo hospitalar (1). O desenvolvimento vascular pulmonar está gravemente prejudicado na HDC, o que implica na hipertensão pulmonar observada nestes neonatos. Entretanto, ainda não está claro o papel dos diferentes fatores de crescimento nesta doença e como eles são afetados por possíveis tratamentos que atuem diretamente sobre o desenvolvimento alveolar e vascular do pulmão.

No modelo de HDC induzida pelo nitrofen há comprometimento do crescimento pulmonar semelhante ao observado em neonatos com a doença (12,17). Este comprometimento se traduz pela diminuição do PPT, PPE e, principalmente, da relação PPT/PC. Neste estudo, foram observadas as alterações esperadas no crescimento pulmonar nos fetos com HDC com diminuição do PPT, do PPE e da relação PPT/PC. Por outro lado, o tratamento pré-natal com ácido retinóico nos dias 18,5, 19,5 e 20,5 não afetou o crescimento pulmonar, o que pode ser observado pela manutenção das variáveis de crescimento pulmonar. Este resultado é similar ao observado por outros autores (45, 46).

Baptista et al. observaram que a administração de retinol no mesmo dia de administração do nitrofen, ou seja, 9,5 dias de gestação, não só diminuiu a frequência de HDC na prole, mas também melhorou a relação PPT/PC e as relações de conteúdo de proteína/PC e conteúdo de DNA/PC em fetos com HDC (45). Da mesma forma, Montedonico et al. observaram que pulmões expostos ao nitrofen em cultura a partir do dia de gestação 13,5 a adição de ácido retinóico por 96 h aumentou o perímetro pulmonar, o conteúdo de DNA total e o número de células proliferativas (46). No entanto, o período em que o tratamento com ácido retinóico se mostrou útil na recuperação da hipoplasia pulmonar na HDC de ratos seria equivalente, na gestação em humanos, a um momento gestacional anterior ao do momento em que o diagnóstico pré-natal de HDC é normalmente realizado, ou seja, ao redor de 24 a 28 semanas.

Em nosso estudo também não observamos alterações da morfometria pulmonar com a administração do ácido retinóico no final da gestação de ratos com HDC, com manutenção da MLI, do DEA e da relação MCT/EA entre fetos com HDC não tratados e tratados. Estes resultados são condizentes com os resultados relatados por Gallot et al. que não

observaram diferenças na morfologia pulmonar com o tratamento pré-natal com ácido retinóico no modelo animal de HDC criada cirurgicamente em fetos de coelho (22).

Os efeitos benéficos do tratamento pré-natal com ácido retinóico ou vitamina A precocemente na gestação de fetos com HDC está provavelmente relacionado à compensação da inibição da enzima RALDH2 pelo nitrofen. No entanto, ainda não se conhece o efeito do tratamento tardio com ácido retinóico, quando as alterações histopatológicas e fisiológicas já estão estabelecidas. Seria de particular interesse o estudo da suplementação do ácido retinóico durante a fase alveolar do desenvolvimento pulmonar uma vez que o ácido retinóico é necessário para o processo de septação e alveolarização. O obstáculo para realização destes estudos em modelos animais, é que a alveolarização se inicia tardiamente nestes modelos – período pós-natal em ratos em últimos dias de gestação em coelhos – e não é possível manter animais neonatos com HDC vivos para realização do tratamento.

Não existem estudos na literatura sobre o efeito dos retinóides nas arteríolas pulmonares normais ou na HDC. Outras intervenções medicamentosas, como a betametasona, demonstraram serem úteis na redução da espessura de arteríolas pulmonares em fetos de coelhos normais (47). Nossos resultados mostraram aumento da espessura da camada média das arteríolas pulmonares, como relatado por outros previamente na HDC (23,24). Além disso, foi observado que o tratamento pré-natal com ácido retinóico reduziu a espessura da camada muscular média em fetos com HDC. Uma vez que a espessura desta camada está diretamente relacionada à hipertensão pulmonar, o tratamento com ácido retinóico pode ser útil na atenuação desta complicação, a qual é um das principais causas de mortalidade nesta doença (6,24).

A hipótese deste estudo foi que um distúrbio na expressão de VEGF e seus receptores FLT-1 e FLK-1 faria parte da patogênese da HDC e que o tratamento pré-natal com ácido retinóico seria capaz de restaurar a expressão deste fator e seus receptores. Para avaliar esta hipótese foi analisada a expressão de VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no modelo de HDC induzida pelo nitrofen em fetos de rato com tratamento pré-natal com ácido retinóico. Foi observada que a expressão de VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 estavam diminuídas nos fetos com HDC e que a expressão de VEGFR1 era restaurada com tratamento pré-natal ácido retinóico na análise por imunistoquímica e western blotting. No entanto, a análise por imunistoquímica

mostrou restauração da expressão de VEGFR2 que não foi observada na análise por western blotting.

Esses dados sugerem que, não só uma alteração na sinalização do VEGF pode estar relacionada à vascularização anormal na HDC, mas também que tratamento, como o ácido retinóico, podem ser especialmente benéfico no manejo da HDC por melhorar a sinalização do VEGF por meio da recuperação da expressão dos seus receptores. Devido à sua teratogenicidade o ácido retinóico está contra-indicado na gravidez. No entanto no final da gestação, seus efeitos na maioria dos tecidos fetais estão reduzidos ou anulados uma vez que a maior parte dos órgãos já está formada. O tratamento com ácido retinóico seria particularmente interessante neste período de menores efeitos adversos, quando há aumento da vascularização e alveolarização pulmonares, que estão prejudicados na doença. Além disso, uma vez esclarecido em detalhes o mecanismo de ação dos retinóides na HDC seria possível a intervenção na via de outras maneiras por meio de administração de precursores, reposição enzimática, ou mesmo terapia gênica de genes-alvo do ácido retinóico.

Apesar de a via de sinalização do VEGF ter sido previamente estudada no mesmo modelo, os resultados foram conflitantes e poucos autores abordaram o papel dos receptores. Hara et al. descreveram diminuição da quantidade de VEGF-A no pulmão de fetos com HDC induzida por nitrofen comparados a fetos expostos ao nitrofen sem HDC e níveis inalterados de RNAm de VEGFR1 e VEGFR2 nestes animais. No entanto, Hara et al. Utilizaram extratos de pulmão total para análise (38), enquanto no presente estudo foi utilizado somente o pulmão esquerdo, o qual é o mais gravemente afetado pela HDC.

Além disso, o VEGF-A e o VEGFR2 trabalham em sistema de retroalimentação positiva, de forma que níveis diminuídos de VEGF-A estão normalmente associados a níveis diminuídos de VEGFR2 devido à diminuição do estímulo de VEGF-A para produção do receptor (48). Desta forma, uma diminuição dos níveis de VEGFR2 estaria consistente com a diminuição de VEGF-A neste modelo como foi relatado por vários outros autores (36,37,38).

Por outro lado, um aumento na quantidade da proteína VEGF-A foi descrita tanto no modelo experimental de HDC induzida por nitrofen (39) quanto em seres humanos (49). Apesar de a razão para os resultados conflitantes não ser clara, Shehata et al. analisaram por meio de imunoistoquímica o pulmão de neonatos com HDC submetidos à necropsia após

tratamento com ventilação mecânica com altos níveis tensionais de oxigênio, o que poderia alterar a produção de VEGF e seus receptores. Apesar disto, níveis elevados de VEGFR2 poderiam ser observados em mesmo com diminuição de VEGF-A se houver um distúrbio do sistema de retroalimentação positiva. O efeito do tratamento pré-natal com ácido retinóico na recuperação da expressão de VEGF e seus receptores não havia sido abordado anteriormente na literatura.

Os receptores VEGFR1 e VEGFR2 apresentam funções diferentes no desenvolvimento vascular. O receptor VEGFR1 é um modulador negativo da divisão das células endoteliais, uma vez que apresenta baixa atividade tirosina quinase, mas alta afinidade pelo VEGF. Ratos knockout para o gene do VEGFR1 não sobrevivem até o final da gestação apresentando hipertrofia e desorganização da vasculatura. Esses dados sugerem que o VEGFR1 seria necessário para o controle da vascularização exercendo um papel organizacional na angiogênese. (29). Já o VEGFR2 tem importante papel mitogênico e de sobrevivência de vasos neoformados sendo o principal estímulo para início da angiogênese e manutenção dos vasos embrionário e fetais. O silenciamento do VEGFR2 leva a óbito precocemente na gestação por abolição da angiogênese (30). Desta forma a expressão e equilíbrio de ambos os receptores são fundamentais para a vascularização adequada.

Finalmente, podemos concluir que nossos resultados foram similares em modelos de coelhos e ovelhas que compartilham de desenvolvimento pulmonar mais semelhante à fase final em humanos (50,51). Apesar de algumas limitações que o modelo do nitrofen, especialmente no que diz respeito à fase de alveolarização pulmonar em ratos que se inicia somente na vida pós-natal, enquanto que em humanos se inicia no fim da gestação, ainda assim, o ácido retinóico teria uma aplicação potencialmente benéfica mais no final da gestação de humanos por estimular a septação, alveolarização e redução da camada média das arteríolas pulmonares (20).

7. CONCLUSÃO

7.1 Geral

O tratamento pré-natal com ácido retinóico alterou a expressão de VEGF e do receptor VEGFR1 no modelo animal de HDC induzida pelo nitrofen.

7.2 Específicas

A administração pré-natal de ácido retinóico nos fetos expostos ao nitrofen com HDC:

7.2.1- não alterou o desenvolvimento e a morfometria pulmonares

7.2.2- reduziu a espessura da camada média das arteríolas pulmonares

7.2.3- restaurou a expressão de VEGF e VEGFR1 quando a expressão dos receptores VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 apresentava-se diminuída na HDC. **8.**

REFERÊNCIAS

1. Tonks A, Wyldes M, Somerset DA, Dent K, Abhyankar A, Bagchi I, et al. Congenital malformations of the diaphragm: findings of the West Midlands Congenital Anomaly Register 1995 to 2000. *Prenatal Diagn* 2004; 24:596 – 604.
2. Doyle NM, Lally KP. The CDH Study Group and advances in clinical care of the patient with congenital diaphragmatic hernia. *Semin Perinatol* 2004; 28:174-184.
3. Greer JJ, Cote D, Allan DW, Zhang W, Babiuk RP, Ly L, et al. Structure of the primordial diaphragm and defects associated with nitrofen-induced CDH. *J Appl Physiol*. 2000;89:2123-2129.
4. Anderson KD. Congenital diaphragmatic hernia In: Welch KJ, Radolph JG, Ravitch MM, O'Neil Jr, JA Ronee MI. *Pediatric Surgery* 4^a ed. Volume1 pág. 589-601.
5. Golombek SG. The history of congenital diaphragmatic hernia from 1850s to the present. *J Perinatol* 2002 Apr-May; 22 (3):242-6
6. Stege G, Fenton A, Jaffray B, Nihilism in the 1990s: the true mortality of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2003; 112:532-535.
7. Lally KP, Lally PA, Meurs KP, Bohn DJ, Davis CF, Rodgers B, et al. Treatment evolution in high risk congenital diaphragmatic hernia: ten years' experience with diaphragmatic agenesis. *Ann Surg* 2006; 244:505-513.
8. Skari H, Bjornland K, Haugen G, Egeland T, Emblem R. Congenital diaphragmatic hernia: a meta-analysis of mortality factors. *J Pediatr Surg* 2000; 35:1187-1197.
9. Greer JJ, Babiuk RP, Thebaud B. Etiology of congenital diaphragmatic hernia: the retinoid hypothesis. *Pediatr Res* 2003; 53(5):726-730.

10. Gray LEJr, Kavlock RJ, Chernoff N, Ferrell J, McLamb J, Ostby J. Prenatal exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenyl-nitrophenyl ether destroys the rodent Harderian gland. *Science* 1982; 215:293–294.
11. Costlow RD, Manson JM. The heart and diaphragm: target organs in the neonatal death induced by nitrofen (2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether). *Toxicology* 1981; 20:1624-1629.
12. Kluth D, Kangah R, Reich P, Tenbrinck R, Tibboel D, Lambrecht W. Nitrofen induced diaphragmatic hernia in rats: an animal model. *J Pediatr Surg* 1990; 25(8): 850–854.
13. Beurskens N, Klaassens M, Rottier R, de Klein A, Tibboel D. Linking animal models to human congenital diaphragmatic hernia. *Birth Defects Research (Part A)* 2007;79:565-572.
14. Clugston RD, Zhang W, Greer JJ. Early development of the primordial mammalian diaphragm and cellular mechanisms of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Birth Defects Research (Part A)* 2010; 88:15-24.
15. Mey J, Babiuk RP, Clugston R, Zhang W, Greer JJ. *Am J Pathol* 2003; 162(2):673-679. Nitrofen-induced diaphragmatic hernia and the effect of prenatal glucocorticoids. *Pediatr Surg Int* 1999; 15:180–183.
16. Noble BR, Babiuk RP, Clugston R, Underhill TM, Sun H, Kawaguchi R, et al. Mechanisms of action of the congenital diaphragmatic hernia-inducing teratogen nitrofen. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293:1079-1087.
17. Thébaud B, Tibboel D, Rambaud C, Mercier JC, Bourbon JR, Dinh-Xuan AT, et al. Vitamin A decreases the incidence and severity of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999; 277:423-429.

18. 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; 286:970–973.
19. Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 2004; 328:1-16.
20. Malpel S, Mendelsohn C, Cardoso WV. Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development* 2000; 127:3057-3067.
21. Roth-Kleiner M & Post M. Similarities and dissimilarities of branching and septation during lung development. *Pediatr Pulm* 2005; 40:113-134.
22. Gallot D, Coste K, Jani J, Roubliova X, Marceau G, Velemir L, et al. Effects of maternal retinoic acid administration in a congenital diaphragmatic hernia rabbit model. *Pediatr Pulm* 2008; 43:594-603.
23. Kitagawa M, Hislop A, Boyde E, Reid L. Lung hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia. A quantitative study of airway artery and alveolar development. *Br J Surg* 1971; 58:342-346.
24. Geggel RL, Murphy JD, Langleben D, Crone RK, Vacanti JP, Reid LM. Congenital diaphragmatic hernia: arterial structural changes and persistent pulmonary hypertension after surgical repair. *J Pediatr* 1985; 107: 457-464.
25. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara V. Vascular endothelial growth factor is secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989 246 (4935): 1306-9.
26. Larrivee B, Karsan A. Signaling pathways induced by vascular endothelial growth factor (review). *Int J Mol Med* 2002 5: 447-56.

27. 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; 255:989-991.
28. Shibuya M. Role of VEGF-Flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1995; 67:281-316.
29. Fong GH, Rossant J, Gertstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine-kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376:66-70
30. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1- deficient mice. *Nature* 1995; 376(6535):62-6.
31. 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; 288:207-223.
32. Jakkula M, Le Cras TD, Gebb S, Hirth KP, Tudor RM, Voelkel NF, et al. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 271:L600-L607.
33. Compernelle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, et al. 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): 702-710.
34. Zhou L, Dey CR, Wert SE, Yan C, Costa RH, Whitsett JA. Hepatocyte nuclear factor-3 β limits cellular diversity in the developing respiratory epithelium and alters lung morphogenesis in vivo. *Dev Dyn* 1997; 210:305-314.

35. Le Cras TD, Markham NE, Tudor RM, Voelkel NF, Abman SH. Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283:555-562.
36. Okazaki T, Sharma HS, Aikawa M, Yamataka A, Nagai R, Miyano T, et al. Pulmonary expression of vascular endothelial growth factor and myosin isoforms in rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1997; 32:391-394.
37. Chinoy MR, Graybill MM, Miller SA, Lang CM, Kauffman GL. Angiopoietin-1 and VEGF in vascular endothelial growth factor and myosin isoforms in rats with congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283:L60-L66.
38. 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; 58:30-37.
39. Oue T, Yoneda A, Shima H, Tira 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; 18:221-226.
40. Saito A, Sugawara A, Uruno A, Kudo N, Kagechika H, Sato Y, et al. All-trans retinoic acid induces in vitro angiogenesis via retinoic acid receptor: possible involvement of paracrine effects of endogenous vascular endothelial growth factor signaling. *Endocrinology* 2007; 148(3):1412-1423.
41. Dunill MS. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax* 1962; 17:320-328.
42. Verbeken EK, Cauberghs M, Mertens I, Clement J, Lauweryns JM, Van de Woestijne KP. The senile lung. Comparison with normal and emphysematous lungs. 1. Structural aspects. *Chest* 1992; 101:739-799.

43. Shehata SM, Sharma HS, van der Stak FH, van de Kaa-Hulsbergen C, Mooi WJ, Tibboel D. Remodeling of pulmonary arteries in human congenital diaphragmatic hernia with or without extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr Surg* 2000; 35:208-215.
44. Bradford MM. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254
45. Baptista MJ, Melo-Rocha G, Pedrosa C, Gonzaga S, Teles A, Estevão-Costa J, et al. Antenatal vitamin A administration attenuates lung hypoplasia by interfering with early instead of late determinants of lung underdevelopment in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2005; 40(4):658-665.
46. Montedonico S, Nakazawa N, Puri P. Retinoic acid rescues lung hypoplasia in nitrofen induced hypoplastic foetal lung rat explants. *Ped Surg Int* 2006; 22(1):2-8.
47. Roubliova XI, der Biest AMV, Vassst P, Lu HQ, Jani JC, Lewi PJ, et al. Effect of maternal administration of betamethasone on peripheral arterial development in fetal rabbit lungs. *Neonatology* 2008; 93: 64-72.
48. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev.* 1997;18:4-25.
49. 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; 54:427-431.
50. Davey MG, Shegu S, Danzer E, Ruchelli E, Adzick NS, Flake AW et al. Pulmonary arteriole muscularization in lambs with congenital diaphragmatic hernia after combined tracheal occlusion/glucocorticoid therapy. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197(4):381.e1-7.

10. APÊNDICES



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 935-1, sobre "PERFIL DOS RECEPTORES VEGF-1 E VEGF-2 NO DESENVOLVIMENTO PULMONAR FETAL E SUA CORRELAÇÃO COM A TRAQUEO-OCCLUSÃO NO MODELO DE HÉRNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÊNITA" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto/Azize Cristina Capelli Nassr está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 12 de dezembro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 935-1, entitled "PROFILE OF VEGF-1 AND VEGF-2 IN A FETAL PULMONARY RAT DEVELOPMENT AND THE RELATIONSHIP WITH TRAQUEO-OCCLUSION IN THE CONGENITAL DIAPHRAGMATIC HERNIA INDUCED BY NITROFEN", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on December 12, 2005.

Campinas, 12 de dezembro de 2005.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

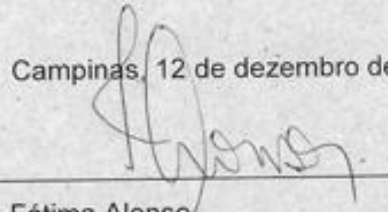

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

Tabela – Resultado das mensurações do Peso Corporal (PC) (mg), Peso do Pulmão Esquerdo (PPE) (mg), Peso Pulmonar Total (PPT) (mg) e relação Peso Pulmonar Total / Peso Corporal (PPT/PC) do grupo Controle Externo (CE).

Feto	PC	PPT	PPE	PPT/PC
1	6503	126	41	0,0194
2	6823	152	50	0,0223
3	3282	113	38	0,0344
4	6278	100	32	0,0159
5	7268	142	44	0,0195
6	6315	123	43	0,0195
7	5431	127	40	0,0234
8	4792	98	33	0,0205
9	4954	94	32	0,0190
10	4457	95	31	0,0213
11	5138	84	33	0,0163
12	6688	147	51	0,0220
13	6419	140	48	0,0218
14	5764	145	47	0,0252
15	6547	141	51	0,0215
16	6962	156	54	0,0224
17	6664	152	55	0,0228
18	5626	135	46	0,0240
19	6373	106	40	0,0166
20	6723	160	52	0,0238
21	6645	146	49	0,0220
22	6335	162	51	0,0256
23	6475	157	49	0,0242
24	6691	164	54	0,0245

25	4912	121	40	0,0246
Média	6003	131	44	0,0221
Desvio-padrão	950,7	24,3	7,7	0,0037

Tabela – Resultado das mensurações do Peso Corporal (PC) (mg), Peso do Pulmão Esquerdo (PPE) (mg), Peso Pulmonar Total (PPT) (mg) e relação Peso Pulmonar Total / Peso Corporal (PPT/PC) do grupo Óleo de Oliva Nitrofen (ON).

Feto	PC	PPT	PPE	PPT/PC
1	6503	126	41	0,0194
2	6823	152	50	0,0223
3	3282	113	38	0,0344
4	6278	100	32	0,0159
5	7268	142	44	0,0195
6	6315	123	43	0,0195
7	5431	127	40	0,0234
8	4792	98	33	0,0205
9	4954	94	32	0,0190
10	4457	95	31	0,0213
11	5138	84	33	0,0163
12	6688	147	51	0,0220
13	6419	140	48	0,0218
14	5764	145	47	0,0252
15	6547	141	51	0,0215
16	6962	156	54	0,0224
17	6664	152	55	0,0228
18	5626	135	46	0,0240
19	6373	106	40	0,0166
20	6723	160	52	0,0238

21	6645	146	49	0,0220
22	6335	162	51	0,0256
23	6475	157	49	0,0242
24	6691	164	54	0,0245
25	4912	121	40	0,0246
Média	6039	159	54	0,0265
Desvio-padrão	442,3	22,9	8,1	0,0025

Tabela – Resultado das mensurações do Peso Corporal (PC) (mg), Peso do Pulmão Esquerdo (PPE) (mg), Peso Pulmonar Total (PPT) (mg) e relação Peso Pulmonar Total / Peso Corporal (PPT/PC) do grupo Óleo de Oliva Ácido Retinóico (OA).

Feto	PC	PPT	PPE	PPT/PC
1	6642	157	55	0,0236
2	6358	161	51	0,0253
3	5918	150	50	0,0253
4	6208	164	52	0,0264
5	6750	136	46	0,0201
6	6237	139	45	0,0223
7	6163	175	56	0,0284
8	5618	132	41	0,0235
9	5626	129	41	0,0229
10	6291	141	47	0,0224
11	5933	128	42	0,0216
12	6491	185	58	0,0285
13	6595	164	52	0,0249
14	6215	144	46	0,0232
15	6172	151	50	0,0245
16	6510	166	50	0,0255

17	6325	166	56	0,0262
18	6123	156	52	0,0255
19	6797	188	63	0,0277
20	5441	151	51	0,0278
21	6548	164	52	0,0250
22	5476	136	40	0,0248
23	6518	167	55	0,0256
24	6430	159	53	0,0247
25	5652	131	42	0,0229
Média	6201	154	50	0,0248
Desvio-padrão	395,0	16,9	5,9	0,0021

Tabela – Resultado das mensurações do Peso Corporal (PC) (mg), Peso do Pulmão Esquerdo (PPE) (mg), Peso Pulmonar Total (PPT) (mg) e relação Peso Pulmonar Total / Peso Corporal (PPT/PC) do grupo Ácido Retinóico (AR).

Feto	PC	PPT	PPE	PPT/PC
1	7195	187	58	0,0260
2	4897	129	45	0,0263
3	4331	100	32	0,0231
4	6548	172	57	0,0263
5	5678	155	49	0,0273
6	5757	155	48	0,0269
7	6986	154	51	0,0220
8	6615	162	47	0,0245
9	6307	154	47	0,0244
10	7122	170	54	0,0239
11	6989	156	51	0,0223
12	7158	166	56	0,0232

13	7153	170	52	0,0238
14	5706	148	50	0,0259
15	5540	130	45	0,0235
16	5554	102	35	0,0184
17	5378	114	42	0,0212
18	6387	143	49	0,0224
19	4620	102	35	0,0221
20	7256	188	58	0,0259
21	6778	163	56	0,0240
22	7458	173	56	0,0232
23	5081	122	43	0,0240
24	6443	188	61	0,0292
25	6815	161	52	0,0236
Média	6230	151	49	0,0241
Desvio-padrão	910,0	26,6	7,6	0,0022

Tabela – Resultado das mensurações do Peso Corporal (PC) (mg), Peso do Pulmão Esquerdo (PPE) (mg), Peso Pulmonar Total (PPT) (mg) e relação Peso Pulmonar Total / Peso Corporal (PPT/PC) do grupo Nitrofen sem HDC (N-).

Feto	PC	PPT	PPE	PPT/PC
1	5764	101	37	0,0175
2	4665	94	33	0,0202
3	5191	118	40	0,0227
4	5555	122	42	0,0220
5	5593	98	32	0,0175
6	6280	121	40	0,0193
7	5301	122	36	0,0230
8	5438	127	51	0,0234

9	4834	106	47	0,0219
10	5501	125	42	0,0227
11	5942	91	28	0,0153
12	5889	92	32	0,0156
13	5670	90	30	0,0159
14	5154	77	30	0,0149
15	5430	94	33	0,0173
16	5673	96	36	0,0169
17	5828	99	34	0,0170
18	5206	109	39	0,0209
19	5213	68	35	0,0130
20	5131	83	32	0,0162
21	5264	115	40	0,0218
22	5201	112	34	0,0215
23	5193	118	45	0,0227
24	5706	130	42	0,0228
25	4952	96	36	0,0194
Média	5423	104	37	0,0195
Desvio-padrão	373,4	16,5	5,7	0,0031

Tabela – Resultado das mensurações do Peso Corporal (PC) (mg), Peso do Pulmão Esquerdo (PPE) (mg), Peso Pulmonar Total (PPT) (mg) e relação Peso Pulmonar Total / Peso Corporal (PPT/PC) do grupo Nitrofen com HDC (HDC).

Feto	PC	PPT	PPE	PPT/PC
1	5514	79	18	0,0143
2	6272	103	28	0,0164
3	6034	95	31	0,0157
4	5760	92	30	0,0160

5	5529	95	33	0,0172
6	5900	102	31	0,0173
7	6064	89	36	0,0147
8	5744	82	21	0,0143
9	4897	66	18	0,0135
10	5201	81	25	0,0156
11	5531	85	22	0,0154
12	4989	101	33	0,0202
13	5225	83	19	0,0159
14	5454	95	21	0,0174
15	5838	78	33	0,0134
16	5799	82	14	0,0141
17	5113	87	20	0,0170
18	4838	72	21	0,0149
19	5277	52	17	0,0099
20	4772	80	24	0,0168
21	4940	73	23	0,0148
22	6163	82	24	0,0133
23	6371	102	31	0,0160
24	5230	76	21	0,0145
25	5683	79	23	0,0139
Média	5526	84	25	0,0153
Desvio-padrão	467,9	12,2	6,1	0,0020

Tabela – Resultado das mensurações do Peso Corporal (PC) (mg), Peso do Pulmão Esquerdo (PPE) (mg), Peso Pulmonar Total (PPT) (mg) e relação Peso Pulmonar Total / Peso Corporal (PPT/PC) do grupo Nitrofen + Ácido Retinóico sem HDC (NAR-).

Feto	PC	PPT	PPE	PPT/PC
1	4466	66	24	0,0148
2	4514	87	33	0,0193
3	5717	112	40	0,0196
4	5134	87	31	0,0169
5	4599	77	29	0,0167
6	4832	93	34	0,0192
7	4961	101	37	0,0204
8	4935	114	38	0,0231
9	4840	115	40	0,0238
10	4737	98	35	0,0207
11	4674	85	33	0,0182
12	5199	120	42	0,0231
13	5427	109	39	0,0201
14	5608	137	47	0,0244
15	5381	139	44	0,0258
16	5542	117	35	0,0211
17	4993	118	41	0,0236
18	5077	129	45	0,0254
19	4466	66	24	0,0148
20	5434	114	43	0,0210
21	5045	107	38	0,0212
22	5150	109	34	0,0212
23	4921	68	22	0,0138
24	4977	86	27	0,0173
25	4806	76	29	0,0158
Média	5040	103	36	0,0203
Desvio-padrão	342,9	20,5	6,6	0,0033

Tabela – Resultado das mensurações do Peso Corporal (PC) (mg), Peso do Pulmão Esquerdo (PPE) (mg), Peso Pulmonar Total (PPT) (mg) e relação Peso Pulmonar Total / Peso Corporal (PPT/PC) do grupo Nitrofen + Ácido Retinóico com HDC (NA+).

Feto	PC	PPT	PPE	PPT/PC
1	5115	107	36	0,0209
2	4754	75	27	0,0158
3	4881	72	24	0,0148
4	4581	72	19	0,0157
5	4948	62	20	0,0125
6	4627	51	19	0,0110
7	5564	80	23	0,0144
8	4761	62	18	0,0130
9	5334	73	21	0,0137
10	5485	83	25	0,0151
11	5102	71	24	0,0139
12	4461	72	26	0,0161
13	5263	91	25	0,0173
14	5410	80	25	0,0148
15	4856	72	23	0,0148
16	5543	81	22	0,0146
17	5482	82	25	0,0150
18	4634	50	20	0,0108
19	5224	67	19	0,0128
20	4975	68	21	0,0137
21	5660	85	28	0,0150
22	4465	62	19	0,0139
23	4850	64	18	0,0132
24	4762	69	23	0,0145

25	4508	66	18	0,0146
Média	5010	73	23	0,0145
Desvio-padrão	378,5	12,2	4,1	0,0020

Tabela – Resultado das mensurações da média linear de interceptação (MLI) e seus componentes diâmetro de espaço aéreo (DEA) e média de comprimento de transecção / espaço aéreo (MCTP) de vinte campos, com duas mensurações por campo, do grupo Controle Externo (CE).

Campo	MLI	DEA	MCTP
1	38,81	18,72	0,5176
	39,13	13,98	0,6428
2	36,07	17,36	0,5188
	58,85	41,37	0,2970
3	45,08	29,51	0,3454
	79,15	43,40	0,4517
4	34,92	14,07	0,5972
	41,16	17,21	0,5818
5	40,19	22,30	0,4451
	32,69	14,74	0,5491
6	28,23	17,05	0,3960
	57,95	37,25	0,3571
7	38,81	17,81	0,5412
	28,39	12,06	0,5751
8	44,56	22,94	0,4851

	34,69	17,19	0,5044
9	35,19	16,90	0,5197
	40,78	24,20	0,4066
10	32,47	21,05	0,3518
	42,15	21,35	0,4935
11	27,99	14,33	0,4880
	29,22	16,44	0,4375
12	52,25	34,61	0,3375
	51,57	36,13	0,2994
13	55,85	30,53	0,4535
	37,77	16,18	0,5715
14	36,04	13,89	0,6146
	50,92	28,37	0,4429
15	35,75	20,63	0,4230
	32,78	19,08	0,4179
16	32,88	21,00	0,3611
	41,05	24,00	0,4153
17	31,25	14,42	0,5387
	24,84	9,88	0,6024
18	25,32	10,14	0,5995
	32,42	22,37	0,3099
19	39,75	19,18	0,5175
	46,26	29,85	0,3547

20	42,74	15,85	0,6291
	33,03	14,56	0,5592
Média	39,72	21,30	0,4738
Desvio-padrão	10,71	8,35	0,0994

Tabela – Resultado das mensurações da média linear de interceptação (MLI) e seus componentes diâmetro de espaço aéreo (DEA) e média de comprimento de transecção / espaço aéreo (MCTP) de vinte campos, com duas mensurações por campo, do grupo Placebo Óleo de Oliva Nitrofen (ON).

Campo	MLI	DEA	MCTP
1	80,77	30,69	50,08
	95,45	33,41	62,05
2	105,00	33,60	71,40
	87,50	24,50	63,00
3	95,45	22,91	72,55
	75,00	25,50	49,50
4	116,67	30,33	86,33
	95,45	26,73	68,73
5	105,00	32,55	72,45
	131,25	36,75	94,50
6	95,45	27,68	67,77
	95,45	41,05	54,41
7	116,67	52,50	64,17

	95,45	24,82	70,64
8	131,25	27,56	103,69
	105,00	30,45	74,55
9	87,50	28,88	58,63
	95,45	37,23	58,23
10	80,77	21,00	59,77
	87,50	21,88	65,63
11	95,45	32,45	63,00
	70,00	31,50	38,50
12	70,00	22,40	47,60
	80,77	33,92	46,85
13	95,45	23,86	71,59
	95,45	21,95	73,50
14	105,00	29,40	75,60
	95,45	20,05	75,41
15	75,00	23,25	51,75
	95,45	25,77	69,68
16	105,00	35,70	69,30
	87,50	24,50	63,00
17	95,45	30,55	64,91
	80,77	32,31	48,46
18	95,45	23,86	71,59
	95,45	24,82	70,64

19	70,00	16,10	53,90
	75,00	17,25	57,75
20	95,45	32,45	63,00
	61,76	27,79	33,97
Média	92,95	28,50	64,45
Desvio-padrão	15,29	6,82	13,58

Tabela – Resultado das mensurações da média linear de interceptação (MLI) e seus componentes diâmetro de espaço aéreo (DEA) e média de comprimento de transecção / espaço aéreo (MCTP) de vinte campos, com duas mensurações por campo, do grupo Placebo Óleo de Oliva Ácido Retinóico (OA).

Campo	MLI	DEA	MCTP
1	105,00	22,05	82,95
	95,45	27,68	67,77
2	75,00	16,50	58,50
	95,45	27,68	67,77
3	87,50	14,00	73,50
	87,50	23,63	63,88
4	105,00	49,35	55,65
	105,00	42,00	63,00
5	75,00	22,50	52,50
	105,00	29,40	75,60
6	116,67	54,83	61,83

	87,50	35,00	52,50
7	95,45	27,68	67,77
	70,00	19,60	50,40
8	75,00	22,50	52,50
	80,77	31,50	49,27
9	95,45	24,82	70,64
	65,63	10,50	55,13
10	70,00	8,40	61,60
	58,33	8,17	50,17
11	87,50	18,38	69,13
	61,76	9,88	51,88
12	80,77	23,42	57,35
	80,77	25,85	54,92
13	87,50	22,75	64,75
	87,50	38,50	49,00
14	105,00	31,50	73,50
	87,50	15,75	71,75
15	105,00	13,65	91,35
	61,76	8,03	53,74
16	70,00	20,30	49,70
	87,50	19,25	68,25
17	95,45	20,05	75,41
	75,00	18,75	56,25

18	105,00	33,60	71,40
	80,77	16,15	64,62
19	87,50	20,13	67,38
	80,77	33,92	46,85
20	131,25	34,13	97,13
	80,77	17,77	63,00
Média	87,24	23,99	63,26
Desvio-padrão	15,76	10,68	11,58

Tabela – Resultado das mensurações da média linear de interceptação (MLI) e seus componentes diâmetro de espaço aéreo (DEA) e média de comprimento de transecção / espaço aéreo (MCTP) de vinte campos, com duas mensurações por campo, do grupo Controle Ácido Retinóico (CA).

Campo	MLI	DEA	MCTP
1	70,00	34,30	35,70
	70,00	17,50	52,50
2	65,63	23,63	42,00
	75,00	15,00	60,00
3	70,00	25,90	44,10
	61,76	16,68	45,09
4	75,00	22,50	52,50
	61,76	11,74	50,03
5	52,50	14,18	38,33

	65,63	23,63	42,00
6	87,50	20,13	67,38
	95,45	25,77	69,68
7	61,76	17,91	43,85
	87,50	28,00	59,50
8	70,00	31,50	38,50
	75,00	35,25	39,75
9	65,63	19,69	45,94
	65,63	21,00	44,63
10	75,00	26,25	48,75
	80,77	21,81	58,96
11	42,00	11,76	30,24
	52,50	20,48	32,03
12	87,50	30,63	56,88
	87,50	27,13	60,38
13	95,45	35,32	60,14
	87,50	31,50	56,00
14	87,50	33,25	54,25
	95,45	47,73	47,73
15	95,45	41,05	54,41
	75,00	36,75	38,25
16	80,77	16,15	64,62
	80,77	25,85	54,92

17	95,45	30,55	64,91
	80,77	24,23	56,54
18	95,45	35,32	60,14
	95,45	21,95	73,50
19	80,77	21,81	58,96
	50,00	13,50	36,50
20	75,00	18,75	56,25
	75,00	27,75	47,25
Média	76,17	25,09	51,08
Desvio-padrão	14,03	8,29	10,66

Tabela – Resultado das mensurações da média linear de interceptação (MLI) e seus componentes diâmetro de espaço aéreo (DEA) e média de comprimento de transecção / espaço aéreo (MCTP) de vinte campos, com duas mensurações por campo, do grupo Nitrofen sem HDC (N-).

Campo	MLI	DEA	MCTP
1	105,00	18,90	86,10
	105,00	17,85	87,15
2	95,45	11,45	84,00
	95,45	12,41	83,05
3	70,00	15,40	54,60
	58,33	18,08	40,25
4	80,77	21,81	58,96

	87,50	20,13	67,38
5	80,77	25,85	54,92
	65,63	22,31	43,31
6	70,00	19,60	50,40
	87,50	37,63	49,88
7	65,63	34,78	30,84
	87,50	14,00	73,50
8	105,00	21,00	84,00
	65,63	16,41	49,22
9	95,45	16,23	79,23
	95,45	21,95	73,50
10	116,67	22,17	94,50
	80,77	12,12	68,65
11	105,00	18,90	86,10
	105,00	15,75	89,25
12	87,50	28,88	58,63
	131,25	17,06	114,19
13	75,00	30,00	45,00
	65,63	15,09	50,53
14	80,77	26,65	54,12
	55,26	19,89	35,37
15	150,00	27,00	123,00
	80,77	17,77	63,00

16	105,00	24,15	80,85
	75,00	23,25	51,75
17	95,45	20,05	75,41
	65,63	19,03	46,59
18	75,00	26,25	48,75
	105,00	31,50	73,50
19	75,00	24,00	51,00
	80,77	26,65	54,12
20	95,45	20,05	75,41
	75,00	19,50	55,50
Média	87,42	21,29	66,14
Desvio-padrão	19,70	5,97	20,60

Tabela – Resultado das mensurações da média linear de interceptação (MLI) e seus componentes diâmetro de espaço aéreo (DEA) e média de comprimento de transecção / espaço aéreo (MCTP) de vinte campos, com duas mensurações por campo, do grupo Nitrofen com HDC (N+).

Campo	MLI	DEA	MCTP
1	95,45	12,41	83,05
	105,00	15,75	89,25
2	95,45	15,27	80,18
	131,25	28,88	102,38
3	75,00	10,50	64,50

	131,25	19,69	111,56
4	70,00	12,60	57,40
	95,45	24,82	70,64
5	105,00	11,55	93,45
	75,00	18,00	57,00
6	95,45	25,77	69,68
	131,25	38,06	93,19
7	150,00	22,50	127,50
	150,00	25,50	124,50
8	105,00	17,85	87,15
	131,25	13,13	118,13
9	150,00	18,00	132,00
	210,00	16,80	193,20
10	80,77	20,19	60,58
	70,00	10,50	59,50
11	150,00	15,00	135,00
	70,00	15,40	54,60
12	116,67	14,00	102,67
	80,77	17,77	63,00
13	95,45	16,23	79,23
	75,00	15,00	60,00
14	175,00	12,25	162,75
	116,67	8,17	108,50

15	210,00	16,80	193,20
	210,00	12,60	197,40
16	150,00	10,50	139,50
	350,00	21,00	329,00
17	262,50	15,75	246,75
	350,00	17,50	332,50
18	116,67	18,67	98,00
	175,00	21,00	154,00
19	105,00	22,05	82,95
	95,45	23,86	71,59
20	131,25	26,25	105,00
	131,25	40,69	90,56
Média	135,48	18,46	117,03
Desvio-padrão	66,67	6,93	66,70

Tabela – Resultado das mensurações da média linear de interceptação (MLI) e seus componentes diâmetro de espaço aéreo (DEA) e média de comprimento de transecção / espaço aéreo (MCTP) de vinte campos, com duas mensurações por campo, do grupo Ácido Retinóico + Nitrofen sem HDC (NA-).

Campo	MLI	DEA	MCTP
1	65,63	21,00	44,63
	70,00	25,90	44,10
2	80,77	17,77	63,00

	70,00	18,90	51,10
3	131,25	18,38	112,88
	80,77	16,96	63,81
4	75,00	21,75	53,25
	87,50	15,75	71,75
5	80,77	21,81	58,96
	116,67	30,33	86,33
6	87,50	21,00	66,50
	87,50	28,88	58,63
7	95,45	26,73	68,73
	105,00	30,45	74,55
8	87,50	20,13	67,38
	150,00	21,00	129,00
9	116,67	22,17	94,50
	131,25	27,56	103,69
10	80,77	15,35	65,42
	95,45	21,95	73,50
11	87,50	16,63	70,88
	150,00	28,50	121,50
12	80,77	16,96	63,81
	131,25	18,38	112,88
13	105,00	31,50	73,50
	116,67	28,00	88,67

14	80,77	13,73	67,04
	95,45	22,91	72,55
15	75,00	18,75	56,25
	80,77	42,00	38,77
16	87,50	18,38	69,13
	61,76	15,44	46,32
17	105,00	16,80	88,20
	75,00	16,50	58,50
18	87,50	23,63	63,88
	105,00	16,80	88,20
19	70,00	20,30	49,70
	95,45	26,73	68,73
20	95,45	22,91	72,55
	80,77	25,85	54,92
Média	94,05	22,11	71,94
Desvio-padrão	21,97	5,80	21,27

Tabela – Resultado das mensurações da média linear de interceptação (MLI) e seus componentes diâmetro de espaço aéreo (DEA) e média de comprimento de transecção / espaço aéreo (MCTP) de vinte campos, com duas mensurações por campo, do grupo Ácido Retinóico + Nitrofen com HDC (NA+).

Campo	MLI	DEA	MCTP
1	131,25	19,69	111,56

	175,00	19,25	155,75
2	116,67	12,83	103,83
	105,00	12,60	92,40
3	262,50	15,75	246,75
	262,50	18,38	244,13
4	175,00	10,50	164,50
	210,00	12,60	197,40
5	95,45	17,18	78,27
	80,77	11,31	69,46
6	116,67	12,83	103,83
	61,76	9,88	51,88
7	87,50	13,13	74,38
	87,50	14,00	73,50
8	116,67	12,83	103,83
	87,50	12,25	75,25
9	131,25	15,75	115,50
	175,00	10,50	164,50
10	350,00	14,00	336,00
	210,00	10,50	199,50
11	116,67	17,50	99,17
	131,25	13,13	118,13
12	150,00	16,50	133,50
	116,67	8,17	108,50

13	131,25	13,13	118,13
	131,25	10,50	120,75
14	350,00	21,00	329,00
	175,00	10,50	164,50
15	116,67	17,50	99,17
	116,67	16,33	100,33
16	116,67	12,83	103,83
	210,00	18,90	191,10
17	210,00	23,10	186,90
	95,45	24,82	70,64
18	150,00	12,00	138,00
	75,00	12,75	62,25
19	105,00	17,85	87,15
	150,00	19,50	130,50
20	87,50	15,75	71,75
	131,25	22,31	108,94
Média	147,61	15,00	132,61
Desvio-padrão	67,33	3,99	66,58

Tabela – Resultado das mensurações do diâmetro externo (DE, μm), diâmetro interno (DI, μm) e espessura proporcional da camada muscular média (ECM) do grupo Controle Externo (CE).

	ED	ID	ECM
1	48,06	22,39	0,5342
2	32,88	14,16	0,5692
3	44,52	19,40	0,5643
4	33,31	13,43	0,5968
5	36,26	20,63	0,4310
6	52,32	25,59	0,5110
7	25,61	10,66	0,5838
8	41,25	19,40	0,5297
9	43,97	17,50	0,6020
10	33,09	13,89	0,5803
11	49,95	11,74	0,7650
12	45,93	14,59	0,6823
13	43,82	25,96	0,4075
14	25,55	8,77	0,6566
15	37,79	16,37	0,5669
16	56,58	47,30	0,1640
17	52,71	38,17	0,2758
18	57,72	46,14	0,2006
19	52,91	40,73	0,2302
20	36,83	22,73	0,3829

21	45,37	36,60	0,1933
22	22,71	10,98	0,5165
23	21,85	16,14	0,2612
24	40,73	23,57	0,4214
25	32,99	23,28	0,2942
26	43,27	35,52	0,1791
27	34,83	21,40	0,3855
28	34,72	20,55	0,4080
29	29,13	16,62	0,4294
30	32,20	18,20	0,4349
31	31,16	18,74	0,3985
32	29,43	13,58	0,5386
33	34,85	13,31	0,6180
34	50,72	29,26	0,4232
35	42,68	26,60	0,3768
36	54,27	25,96	0,5216
37	40,45	16,14	0,6009
38	53,49	22,32	0,5827
39	46,79	28,84	0,3836
40	45,43	35,37	0,2214
Média	40,45	22,56	0,4506
Desvio-padrão	9,68	9,73	0,1537

Tabela – Resultado das mensurações do diâmetro externo (DE, μm), diâmetro interno (DI, μm) e espessura proporcional da camada muscular média (ECM) do grupo Óleo de Oliva Nitrofen (ON).

	ED	ID	ECM
1	26,17	16,46	0,3709
2	45,06	21,81	0,5160
3	41,10	22,47	0,4533
4	28,75	14,82	0,4847
5	32,61	21,64	0,3366
6	29,04	14,30	0,5075
7	43,77	22,13	0,4944
8	49,42	37,00	0,2513
9	37,37	20,47	0,4523
10	32,01	16,35	0,4892
11	39,31	17,81	0,5469
12	37,54	22,53	0,4000
13	49,62	40,77	0,1784
14	50,72	34,89	0,3120
15	30,61	20,59	0,3272
16	58,41	35,96	0,3844
17	52,34	37,75	0,2788
18	46,85	22,04	0,5296
19	33,45	17,48	0,4774

20	33,71	18,23	0,4592
21	57,26	37,84	0,3391
22	46,40	27,13	0,4153
23	49,93	28,68	0,4257
24	35,72	22,04	0,3832
25	32,06	21,83	0,3192
26	30,26	16,50	0,4549
27	33,97	19,12	0,4371
28	42,47	20,55	0,5160
29	29,89	11,42	0,6181
30	26,17	15,63	0,4027
31	41,26	22,07	0,4651
32	33,78	12,63	0,6261
33	37,89	14,74	0,6109
34	45,74	24,70	0,4601
35	39,44	20,34	0,4842
36	32,37	20,65	0,3620
37	42,05	27,91	0,3362
38	37,83	17,16	0,5465
39	39,37	18,90	0,5198
40	42,03	21,83	0,4807
Média	39,34	22,43	0,4363
Desvio-padrão	8,32	7,42	0,0999

Tabela – Resultado das mensurações do diâmetro externo (DE, μm), diâmetro interno (DI, μm) e espessura proporcional da camada muscular média (ECM) do grupo Óleo de Oliva Ácido Retinóico (OA).

	ED	ID	ECM
1	30,41	17,76	0,4160
2	30,65	17,26	0,4368
3	30,81	17,48	0,4326
4	39,62	23,08	0,4176
5	45,26	23,96	0,4706
6	34,78	14,42	0,5854
7	36,35	26,35	0,2752
8	38,40	25,18	0,3443
9	33,69	20,42	0,3939
10	37,23	21,47	0,4235
11	37,46	26,16	0,3018
12	38,14	13,80	0,6381
13	44,83	23,47	0,4765
14	51,05	31,97	0,3738
15	30,19	14,64	0,5151
16	44,01	22,26	0,4942
17	29,91	15,95	0,4668
18	41,86	23,75	0,4327
19	35,53	16,34	0,5403

20	42,84	18,18	0,5755
21	33,98	21,55	0,3657
22	40,12	23,68	0,4098
23	28,39	14,62	0,4850
24	29,71	16,79	0,4349
25	43,47	22,60	0,4800
26	27,40	14,07	0,4866
27	58,72	24,75	0,5785
28	32,67	14,93	0,5431
29	39,64	16,99	0,5715
30	43,71	26,67	0,3897
31	49,50	22,87	0,5379
32	33,34	12,54	0,6239
33	41,33	19,37	0,5313
34	31,69	20,77	0,3446
35	30,87	20,16	0,3469
36	47,09	25,15	0,4659
37	46,73	23,75	0,4918
38	46,10	32,04	0,3049
39	32,01	22,28	0,3038
40	41,07	22,15	0,4607
Média	38,26	20,79	0,4542
Desvio-padrão	7,19	4,78	0,0917

Tabela – Resultado das mensurações do diâmetro externo (DE, μm), diâmetro interno (DI, μm) e espessura proporcional da camada muscular média (ECM) do grupo Controle Ácido Retinóico com HDC (CA).

	ED	ID	ECM
1	50,37	30,36	0,3973
2	30,36	13,30	0,5620
3	55,09	23,18	0,5792
4	23,91	13,71	0,4267
5	35,80	27,60	0,2292
6	46,58	24,21	0,4803
7	33,36	12,82	0,6158
8	36,13	16,20	0,5517
9	49,47	24,31	0,5086
10	40,17	21,93	0,4542
11	52,30	35,72	0,3170
12	45,99	26,00	0,4347
13	58,00	30,93	0,4666
14	35,21	13,44	0,6183
15	33,34	16,44	0,5067
16	32,04	16,35	0,4898
17	24,55	12,60	0,4869
18	43,57	22,30	0,4883
19	20,55	11,05	0,4621

20	49,43	39,04	0,2103
21	30,87	19,82	0,3578
22	52,30	41,30	0,2103
23	31,21	19,72	0,3683
24	39,45	31,24	0,2082
25	34,54	25,13	0,2724
26	31,52	22,85	0,2751
27	38,92	26,57	0,3174
28	32,04	20,47	0,3613
29	31,32	21,97	0,2987
30	38,80	31,24	0,1947
31	30,62	21,71	0,2912
32	40,25	31,24	0,2237
33	30,03	18,43	0,3863
34	35,62	25,12	0,2948
35	30,17	17,76	0,4113
36	33,44	17,26	0,4839
37	38,63	21,47	0,4443
38	42,31	17,45	0,5876
39	30,19	17,83	0,4094
40	33,10	22,87	0,3091
Média	37,54	22,57	0,3998
Desvio-padrão	8,87	7,26	0,1229

Tabela – Resultado das mensurações do diâmetro externo (DE, μm), diâmetro interno (DI, μm) e espessura proporcional da camada muscular média (ECM) do grupo Nitrofen sem HDC (N-).

	ED	ID	ECM
1	53,66	27,13	0,4944
2	54,89	32,45	0,4088
3	43,29	19,37	0,5524
4	57,83	21,40	0,6299
5	40,31	22,49	0,4421
6	51,17	27,86	0,4556
7	48,89	29,71	0,3923
8	52,98	19,00	0,6413
9	47,55	20,99	0,5586
10	48,41	17,81	0,6320
11	42,42	27,03	0,3627
12	53,83	34,32	0,3624
13	39,29	18,25	0,5356
14	56,80	19,76	0,6522
15	38,17	21,69	0,4317
16	32,42	17,38	0,4640
17	41,47	22,73	0,4520
18	48,48	31,10	0,3584
19	38,15	13,37	0,6496
20	36,08	19,54	0,4584

21	47,86	19,42	0,5943
22	33,64	23,28	0,3078
23	30,15	14,61	0,5154
24	57,58	29,68	0,4845
25	52,30	28,04	0,4640
26	36,99	11,67	0,6845
27	39,94	27,80	0,3041
28	34,54	20,22	0,4146
29	31,06	15,55	0,4994
30	34,72	21,00	0,3949
31	32,89	14,16	0,5694
32	49,84	33,78	0,3222
33	37,48	19,35	0,4837
34	53,25	31,72	0,4044
35	46,66	30,11	0,3546
36	34,44	15,90	0,5383
37	39,25	23,08	0,4121
38	49,27	22,83	0,5366
39	35,02	18,49	0,4720
40	40,03	16,14	0,5967
Média	43,58	22,51	0,4822
Desvio-padrão	8,29	6,06	0,1030

Tabela – Resultado das mensurações do diâmetro externo (DE, μm), diâmetro interno (DI, μm) e espessura proporcional da camada muscular média (ECM) do grupo Nitrofen com HDC (N+).

	ED	ID	ECM
1	52,95	20,45	0,6138
2	41,46	22,26	0,4631
3	49,18	21,35	0,5659
4	40,96	13,74	0,6646
5	59,83	31,08	0,4805
6	40,66	17,86	0,5607
7	43,82	19,00	0,5663
8	37,54	11,12	0,7038
9	45,99	20,63	0,5514
10	47,01	24,81	0,4723
11	30,95	12,25	0,6041
12	21,81	8,39	0,6151
13	36,81	11,00	0,7012
14	33,97	15,59	0,5413
15	38,08	18,06	0,5256
16	43,92	19,72	0,5510
17	39,52	16,84	0,5739
18	33,53	14,22	0,5759
19	51,14	29,14	0,4302
20	50,91	16,46	0,6766

21	42,06	12,79	0,6958
22	36,52	14,07	0,6148
23	48,91	15,53	0,6825
24	56,22	26,42	0,5300
25	50,28	19,00	0,6221
26	37,91	18,72	0,5062
27	35,35	13,80	0,6095
28	36,87	15,24	0,5867
29	40,78	10,89	0,7329
30	38,30	13,24	0,6542
31	47,79	19,38	0,5944
32	47,07	23,32	0,5045
33	38,33	17,39	0,5463
34	49,34	20,28	0,5890
35	40,86	16,89	0,5866
36	40,85	11,03	0,7299
37	42,96	23,29	0,4579
38	51,31	21,08	0,5891
39	31,25	6,09	0,8051
40	42,75	16,79	0,6073
Média	42,39	17,48	0,5920
Desvio-padrão	7,54	5,37	0,0830

Tabela – Resultado das mensurações do diâmetro externo (DE, μm), diâmetro interno (DI, μm) e espessura proporcional da camada muscular média (ECM) do grupo Nitrofen + Ácido Retinóico sem HDC (NA-).

	ED	ID	ECM
1	32,99	10,01	0,6964
2	35,09	17,86	0,4910
3	49,79	27,84	0,4410
4	32,81	21,15	0,3552
5	36,37	14,27	0,6078
6	35,23	11,62	0,6701
7	31,80	14,44	0,5459
8	30,88	14,34	0,5357
9	48,86	29,23	0,4018
10	37,90	20,55	0,4578
11	30,48	14,87	0,5121
12	37,37	19,38	0,4815
13	44,72	29,63	0,3375
14	33,90	17,39	0,4872
15	35,40	23,90	0,3248
16	51,21	38,29	0,2523
17	30,31	18,36	0,3943
18	33,73	21,35	0,3671
19	45,26	26,98	0,4040

20	39,73	21,01	0,4711
21	42,97	20,75	0,5170
22	30,62	13,77	0,5505
23	30,96	22,42	0,2759
24	55,07	28,04	0,4909
25	42,10	28,14	0,3316
26	34,56	18,94	0,4519
27	37,00	17,91	0,5160
28	39,72	19,21	0,5164
29	35,09	15,35	0,5625
30	58,18	35,17	0,3955
31	36,99	25,12	0,3209
32	39,27	21,13	0,4620
33	36,55	23,38	0,3605
34	58,14	40,76	0,2988
35	31,03	15,35	0,5053
36	48,62	26,75	0,4497
37	39,28	19,18	0,5118
38	34,04	25,26	0,2578
39	40,05	18,37	0,5414
40	48,09	23,04	0,5210
Média	39,30	21,76	0,4518
Desvio-padrão	7,76	6,86	0,1062

Tabela – Resultado das mensurações do diâmetro externo (DE, μm), diâmetro interno (DI, μm) e espessura proporcional da camada muscular média (ECM) do grupo Nitrofen + Ácido Retinóico com HDC (NA+).

	ED	ID	ECM
1	32,99	10,01	0,6964
2	35,09	17,86	0,4910
3	49,79	27,84	0,4410
4	32,81	21,15	0,3552
5	36,37	14,27	0,6078
6	35,23	11,62	0,6701
7	31,80	14,44	0,5459
8	30,88	14,34	0,5357
9	48,86	29,23	0,4018
10	37,90	20,55	0,4578
11	30,48	14,87	0,5121
12	37,37	19,38	0,4815
13	44,72	29,63	0,3375
14	33,90	17,39	0,4872
15	35,40	23,90	0,3248
16	51,21	38,29	0,2523
17	30,31	18,36	0,3943
18	33,73	21,35	0,3671
19	45,26	26,98	0,4040

20	39,73	21,01	0,4711
21	42,97	20,75	0,5170
22	30,62	13,77	0,5505
23	30,96	22,42	0,2759
24	55,07	28,04	0,4909
25	42,10	28,14	0,3316
26	34,56	18,94	0,4519
27	37,00	17,91	0,5160
28	39,72	19,21	0,5164
29	35,09	15,35	0,5625
30	58,18	35,17	0,3955
31	36,99	25,12	0,3209
32	39,27	21,13	0,4620
33	36,55	23,38	0,3605
34	58,14	40,76	0,2988
35	31,03	15,35	0,5053
36	48,62	26,75	0,4497
37	39,28	19,18	0,5118
38	34,04	25,26	0,2578
39	40,05	18,37	0,5414
40	48,09	23,04	0,5210
Média	39,30	21,76	0,4518
Desvio-padrão	7,76	6,86	0,1062

Tabela – Resultado da análise semiquantitativa da imunomarcção para VEGF dos grupos estudados. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico. 0= negativo; 1= fraco; 2= moderado; 3= forte; 4= muito forte.

CE	ON	OA	CA	N-	N+	NA-	NA+
2	2	1	2	1	0	2	3
2	1	1	1	1	1	1	1
1	2	1	2	1	0	1	2
2	1	2	2	2	0	2	3
2	1	3	2	3	0	1	2
1	3	1	2	1	1	2	3
2	1	2	2	3	1	2	1
2	2	1	2	2	1	3	2
1	1	1	2	1	2	2	1
1	1	2	2	3	2	3	1
1	1	1	2	3	1	3	2
1	2	1	2	2	1	3	1
3	2	2	2	1	2	2	2
2	1	2	1	1	2	2	3
2	2	2	1	1	0	1	3
3	2	2	2	1	1	1	2
3	1	2	1	1	0	1	3
2	2	2	1	1	1	1	3

Tabela – Resultado da análise semiquantitativa da imunomarcção para VEGFR1 dos grupos estudados. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico. 0= negativo; 1= fraco; 2= moderado; 3= forte; 4= muito forte.

CE	ON	OA	CA	N-	N+	NA-	NA+
3	3	2	1	4	0	0	2
4	2	2	2	3	0	2	3
3	2	2	4	2	1	1	3
2	2	3	1	2	0	1	3
3	1	2	2	3	0	3	3
2	2	3	4	2	1	1	2
3	2	2	1	3	1	1	3
1	1	2	0	3	2	3	3
2	2	1	3	2	1	3	2
4	3	3	2	3	3	3	3
3	1	1	1	3	3	3	3
4	2	2	3	2	2	2	0
3	3	3	1	2	1	2	3
2	3	2	2	1	1	0	2
1	3	2	4	1	1	2	0
2	3	2	1	2	2	2	4
1	3	1	1	1	3	0	2
2	3	1	4	1	2	3	4

Tabela – Resultado da análise semiquantitativa da imunomarcção para VEGFR2 dos grupos estudados. CE: Controle externo; ON: Placebo óleo de oliva nitrofen; OA: Placebo óleo de oliva ácido retinóico; CA: Controle ácido retinóico; N-: Nitrofen sem HDC; N+: Nitrofen com HDC; NA-: Nitrofen sem HDC tratado com ácido retinóico; NA+: Nitrofen com HDC tratado com ácido retinóico. 0= negativo; 1= fraco; 2= moderado; 3= forte; 4= muito forte.

CE	ON	OA	CA	N-	N+	NA-	NA+
2	1	3	1	1	1	3	3
1	2	2	1	0	1	4	2
2	1	3	2	0	1	3	2
1	2	2	1	1	2	2	3
1	3	2	1	1	1	3	2
2	1	1	2	0	1	3	2
2	2	2	1	2	1	1	2
2	3	2	3	1	1	1	2
1	0	1	2	3	1	1	1
3	2	2	1	3	1	2	3
2	1	1	3	2	2	0	2
1	3	1	1	3	1	2	1
1	2	2	2	2	1	2	2
2	2	0	2	1	1	1	2
2	3	1	3	2	1	1	3
2	2	3	2	2	1	2	2
3	1	2	2	2	1	1	2
2	1	3	2	2	2	1	2