

Olinda Maria Gomes da Costa (Vilas Boas)<sup>n.º 13</sup>

*Este exemplar foi devidamente corrigido,  
conforme resolução C. C. P. G. / 036/83*

*Piracicaba, 26-01-93*

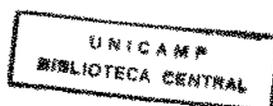
*Ant. J. ...*

Hipervitaminose A experimental no rato. I. Estudo cariométrico do epitélio dos túbulos contorcidos proximal, distal e alça de Henle do rim de fetos cujas mães foram tratadas com diferentes dosagens de vitamina A. II. Estudo da relação dose – efeito.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências – Área de Farmacologia.

Piracicaba

1992



Às minhas filhas: Luciana e Beatriz

Ao Prof. Dr. José Renan Vieira da Costa, pela partilha do saber com seus colegas e orientados, presto esta especial homenagem.

## Agradecimentos

Na tarefa de agradecer, torna-se impossível retribuir a todos o muito que desejaria. Quero expressar aqui, entretanto, meus agradecimentos:

à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, através de seu Digníssimo Diretor, Prof. Dr. Renato Roberto Biral, e seu Diretor Associado, Prof. Dr. Osvaldo Di Hipólito Júnior, pela oportunidade que nos ofereceu para a realização do pós-graduação, bem como à Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – através de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Carlos Alberto Vogt, pelo incentivo dispensado aos que se dedicam ao ensino e a pesquisa;

à Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, através de seu Digníssimo Diretor, Prof. João Batista Magalhães, pelo seu empenho e apoio aos professores na conquista de suas realizações profissionais;

à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo auxílio de pesquisa;

à Coordenadoria de Pós-graduação em Farmacologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, em especial à Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria de Lourdes Garboggini da Gama, pelos ensinamentos recebidos, convívio amigo e orientação segura no decorrer do curso de pós-graduação;

às Professoras: Dra. Ana Maria Duarte Dias Costa, Sra. Fátima de Souza e Dra. Maria Amália Valadão Dias, pela colaboração e amizade;

ao Sr. Silas Barbosa Maia, pelo cuidado com os animais experimentais;

à Sra. Ophélia Violeta do Prado Gomes e ao Prof. Vinicius Vicira Vignoli, pelo auxílio nas traduções;

à Srta. Maria Angela Rodrigues e ao Sr Paulo Amaral, pela colaboração no preparo das peças histológicas;

ao Bel. Paulo Cesar de Andrade, do CPD da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, e à Dra. Sônia Vicira, da disciplina de Bioestatística da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo auxílio nas análises estatísticas;

ao Eng. Paulo Cesar Gomes do Couto Filho, pela execução dos trabalhos computadorizados;

aos colegas do curso de pós-graduação em Farmacologia da FOP, pelo convívio amigo;

aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia e do Departamento de Ciências Biológicas da EFOA, bem como aos professores e funcionários da FOP, pelos ensinamentos recebidos;

a todos que, no decorrer destes anos tornaram-se, sobretudo, amigos.

Enfim, agradeço especialmente, ao meu esposo Gerson Vilas Boas Filho, e aos meus pais Juscelino Barbosa da Costa e Aracy Gomes da Costa, pelo carinho e compreensão que sentem por mim.

## Sumário

Dedicatória	i	
Homenagem	ii	
Agradecimentos	iii	
1	Introdução	1
1.1	Vitamina A – Considerações Gerais	2
1.2	Hipervitaminose A Fetal	4
1.3	Vitamina A e Rins	8
1.4	Proposição	11
2	Material e Métodos	12
2.1	Determinação do Primeiro Dia de Prenhez	13
2.2	Material	13
2.3	Técnica de Dissecção e Pesagem	14
2.4	Técnicas Histológicas	14
2.5	Técnica Morfológica	14
2.5.1	Cariometria	14
2.5.2	Cálculo da constante para a equação do volume elipsóide, quando a ampliação é de 1140x	15
2.6	Técnicas Estatísticas	17
2.6.1	Teste da Mediana (Siegel, 1956)	17
3	Resultados	19
3.1	Resultados Morfológicos	20
3.1.1	Peso Corporal	20
3.1.2	Peso da Placenta	22
3.1.3	Comprimento do Cordão Umbilical	23
3.1.4	Peso do Rim	23
3.1.5	Anomalias Congênitas Causadas por Hipervitaminose A	26
3.2	Resultados Morfométricos	27
3.2.1	Cariometria	27
a)	Túbulos proximais	29

	b) Túbulos distais	30
	c) Alça de Henle	32
4	Discussão	97
5	Conclusão	106
6	Resumo	108
7	Summary	111
8	Referências Bibliográficas	114

# 1 Introdução

## 1.1 Vitamina A – Considerações Gerais

A vitamina A desempenha várias funções importantes no organismo. Além de possuir um papel essencial na função da retina, é necessária ao crescimento ósseo, à reprodução e ao desenvolvimento embrionário.

Desde a antiguidade conhecia-se que a deficiência da vitamina A levava à cegueira, porém, foi com os trabalhos experimentais de diversos pesquisadores, no início do século, que se chegou à descoberta do princípio vitamínico. Hopkins (1912), McCollum e Davis (1913) e Osborne e Mendel (1914), trabalhando isoladamente, observaram que animais submetidos a dietas purificadas desenvolviam uma deficiência nutricional acompanhada de lesões oculares e infecções recorrentes, que podiam ser corrigidas pela adição de manteiga, gema de ovo ou óleo de fígado de bacalhau à ração alimentar. A extração etérea destas fontes de gordura forneceu uma substância que foi denominada "A lipossolúvel" por McCollum e Davis (1913). Posteriormente, observações clínicas em crianças confinadas em instituições confirmaram o significado da vitamina A para a saúde humana (Sommer, 1989).

A vitamina A ocorre em tecidos animais, porém muitos

vegetais contém substâncias com atividade pró-vitáminica A ou carotenóides (Olsson, 1989). O caroteno é uma molécula simétrica que possui dois anéis de  $\beta$ -ionona ligados por uma cadeia carbônica. As substâncias que apresentam estrutura semelhante são compostos precursores da vitamina A. Todavia, o termo "vitamina A" apenas é usado para os derivados da  $\beta$ -ionona que apresentam atividade biológica do todo-transretinal. As formas da vitamina A incluem o retinol, o retinal e vários retinilésteres (Bendich e Langseth, 1989). Atualmente, a denominação retinóide tem sido adotada tanto para estas formas da vitamina A, como para os análogos sintéticos que podem apresentar, ou não, a atividade do retinol (Goodman, 1980).

Após a ingestão, os retinilésteres sofrem hidrólise no intestino, liberando o retinol que é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal normal. Nas células da mucosa intestinal, o retinol torna a reesterificar, principalmente a palmitato. Desta forma, o éster ácido-lipídico é transportado na fração quilômica da linfa e é estocado no fígado sob a forma de éster palmitato. Antes de sua liberação do fígado para a circulação, os retinilésteres são hidrolisados a retinol (Gorodischer, 1990). A síntese e a hidrólise dos retinilésteres podem também se processar em tecidos extrahepáticos como os rins, os pulmões e testículos (Napoli e cols., 1989).

O transporte plasmático do retinol envolve a formação de um complexo entre o próprio retinol associado a uma proteína-ligadora de retinol (RBP) e prealbumina, também conhecida como transtiretina (Blaner, 1989). Algumas vezes o hormônio tiroxina pode aparecer agregado ao complexo (Goodman, 1980). Os rins participam do processo de metabolismo da vitamina A promovendo o desmembramento da transtiretina da RBP e a posterior catálise da RBP (Gerlach e Zile, 1990).

Existem vários sub-tipos de RBP; no útero de porcas grávidas foi encontrada uma RBP cuja função é translocar o retinol para o feto. Outras RBP podem assumir funções enzimáticas como: participação no processo de redução do retinaldeído a retinol no intestino, ou posteriormente, na reesterificação do retinol a retinilésteres no fígado (Wolf, 1991).

O retinol ligado a RBP alcança a membrana celular dos vários órgãos. O retinol penetra na célula e interage com outra proteína específica, a RBP celular (Ong & Chytil, 1975). Wolf (1991) propõe que o retinol, associado a uma proteína específica,

alcança o núcleo da célula, dissocia-se de seu carreador, liga-se à cromatina e modula a expressão genética, aumentando ou retardando a síntese de proteínas específicas.

Após exercer seus efeitos celulares, o retinol sofre uma glucoronidação e uma oxidação transformando-se em retinal e ácido retinóico, metabólitos hidrossolúveis, que são excretados nas fezes e na urina. As mães que amamentam, e que estejam alimentando-se adequadamente, apresentam também concentrações adequadas de vitamina A no colostro e no leite (Gorodischer, 1990).

A ingestão materna de retinol levou Takahashi e cols. (1977) a observar, em fetos de ratos, que a vitamina A acumula-se no concepto em três fases. Na primeira fase (dias 7 e 9 da gestação) a acumulação da vitamina A não é acompanhada pela acumulação da RBP. Na segunda fase, há uma correlação entre o acúmulo da RBP e o aumento de peso do concepto. Na terceira fase, a vitamina A acumula-se mais rapidamente que o aumento de peso do concepto, decorrente da acumulação no feto, em particular no fígado fetal. A vitamina A provavelmente cruza a placenta como um complexo retinol-RBP (Gorodischer, 1990).

## 1.2 Hipervitaminose A Fetal

Vários estudos têm demonstrado que a vitamina A transferida durante a gestação é necessária ao desenvolvimento fetal (Yassai e Malek, 1989). No entanto, quando ocorre uma ingestão de quantidades excessivas de vitamina A de forma aguda ou crônica, pela mãe, há uma alta prevalência de acidentes teratogênicos no neonato. As malformações geralmente envolvem o crânio e a face, incluindo o sistema nervoso central, o coração e o timo (Gorodischer, 1990), bem como o aparelho renal (Bernhardt & Dorsey, 1974).

Os primeiros trabalhos que descreveram malformações devidas à hipervitaminose A, são de 1934. Chevalier e cols. já observavam que o excesso de vitamina A afetava o crescimento e a sobrevivência dos animais de experimentação. Lewis e Reti (1934), trabalhando com vários preparados tópicos e orais de vitamina A (40.000 UI), observaram sintomas cutâneos como inflamação da pele e conjuntiva, perda de peso e morte. Cohan (1953 e 1954), verificou nas ninhadas de ratos cujas mães que receberam a vitamina em doses excessivas: exencefalia, hidrocefalia, meningocelo, "*spina bifida*", anormalidades oculares e catarata.

Estas alterações também foram observadas por Giroud & Martinet (1955 e 1956a, b) e por Giroud e cols. (1958). Estes autores observaram: anencefalia, anoftalmia, microftalmia, malformações nas orelhas, micromelia, sindactilia, aplasia de pálpebras, exoftalmia e fissura mediana inferior e hidronefrose.

Em 1959, Deuschle e cols. descreveram, no rato recém-nascido, cujas mães receberam doses excessivas de vitamina A (75.000 UI e 150.000 UI), oralmente, malformações oculares, maxilares e dentais. Mais tarde, Kalter & Deuschle (1966), descreveram malformações nos olhos e no conduto auditivo.

Singh & Singh (1974) e Padmanabhan e cols. (1981), estudando os efeitos da hipervitaminose A no olho do feto de rato, verificaram malformações tais como: exoftalmia, catarata, microftalmia e anoftalmia. Observaram, histologicamente, alterações degenerativas na córnea, cristalino e retina, estreitamento e obliteração das câmaras anterior e vítrea, além da fusão completa de várias estruturas nos casos de microftalmia.

Os experimentos empregando a hipervitaminose A com o intuito de provocar malformações não se restringiram somente a ratos e camundongos. No coelho, Giroud & Martinet (1959) obtiveram 50% de abortos e grande porcentagem de malformações como: atrofia dos membros, redução do número de dedos, estreitamento transversal da face, hemorragias no cristalino, descolamento da retina e fibrose do humor vítreo.

No hamster, Marin-Padilla & Fern (1965) observaram: anencefalia, anotia, hipoplasia das órbitas, "*spina bifida*", defeitos nas costelas, defeitos nos membros e hérnias.

Os efeitos teratogênicos da vitamina A dependem do período de prenhez no qual ela é administrada e da dose empregada. A influência da vitamina A no período de prenhez está bem estabelecida – ela induz morte nos primeiros dias e teratogenia no período compreendido entre o 8º e o 13º dia de prenhez do animal; período este que Giroud (1963) denominou de crítico ou teratogênico. Em uma revisão da literatura pertinente, Biesalski (1989) relacionou diversos trabalhos com animais onde demonstra uma série de anomalias relacionadas aos valores administrados de vitamina A. Desta forma, em ratos, foram verificadas as seguintes alterações, correspondentes às doses, durante o período compreendido entre o 8º e o 11º dia de prenhez: malformação do sistema nervoso central: exencefalia (20.000 UI – 60.000

UI) e hidrocefalia (40.000 UI); malformações auditivas: no ouvido externo (200.000 UI); malformações oculares: anoftalmia e microftalmia (20.000 UI - 60.000 UI); malformações craniofaciais: palato fendido (60.000 UI) e síndrome oculo-facial (50.000 UI); malformações do sistema esquelético: hipoplasia e sindactília (200.000 UI); malformações urogenitais: hidroureter e hidronefrose (50.000 UI).

Os efeitos teratogênicos da vitamina A em animais durante o período pós-implantação estão bem estabelecidos (Geelen, 1979) existindo para a espécie humana uma maior conscientização sobre o potencial embriotóxico desta vitamina e de seus derivados (Rosa e cols., 1986). Durante o período de pré-implantação, o embrião parece ser relativamente resistente aos efeitos tóxicos da vitamina A (Austin, 1973; Tuchmann-Du Plessis, 1975), embora se conheça bem pouco sobre a ação do excesso de vitamina A neste período específico. Adams, Hay e cols. (1961) não verificaram efeitos deletérios, advindos da administração da vitamina A em excesso, sobre o blastocisto ou sobre as fases subseqüentes do desenvolvimento de coelhos. Entretanto, Morriss (1972) analisando 144 ratos recém-nascidos, observou que oito deles apresentavam malformações do sistema nervoso central, em consequência da administração de doses elevadas de vitamina A às mães, antes da implantação embrionária. Estas anormalidades foram consideradas devido às alterações induzidas nas mães. Em estudo bem recente, Pillans e cols. (1988) observaram que a administração de 5.000 UI, 10.000 UI, 15.000 UI e 30.000 UI de palmitato de vitamina A na sexagésima hora após a cópula, não afetou o blastocisto de oitenta e uma horas. Entretanto, nos fetos tratados com 10.000 UI e 15.000 UI desta vitamina e examinados no 18º dia de prenhez ocorreu exoftalmia, anoftalmia, microftalmia, exencefalia, exonfalia e defeitos dos membros; explicáveis talvez pela persistência da vitamina A na mãe ou no embrião até o período de organogênese.

A dose é importante e pode variar desde 50.000 UI até 150.000 UI, muito embora Giroud e cols. (1956), afirmem que mesmo doses baixas, como 1.000 UI, ainda são teratogênicas e não importa o quanto de vitamina A seja administrada, pois sua concentração no feto malformado é sempre duas vezes maior do que aquela encontrada nos fetos normais. Fetos de gestantes que ingeriram quantidades de vitamina A na faixa entre 18.000 UI e 500.000 UI, apresentaram dimorfismo facial com anormalidades nos olhos, boca e lábios e mandíbulas; malformações cardíacas; ausência da genitália externa; fechamento dos esfíncteres

anais e uretais, rins policísticos, unilaterais ou com hidronefrose (Hathcock e cols., 1990).

Estes efeitos teratogênicos dependem ainda da forma química da vitamina. Por exemplo, o retinal afeta os olhos, o retinol parece estar relacionado com o sistema reprodutor e o ácido retinóico afeta os demais tecidos do organismo (Marks, 1974). O ácido retinóico é a forma ácida solúvel da vitamina A e é, provavelmente, a mais tóxica das três formas desta vitamina (Thompson & Pitt, 1960; Thompson, 1965; Kochhar, 1967, 1973).

A tretinoína (TR) e a isotretinoína (ITR) que, são derivadas do ácido retinóico, também são teratogênicas. Em ratos e camundongos, a isotretinoína mostrou-se menos teratogênica que a tretinoína; sendo, no entanto, teratogênica na espécie humana em doses muito baixas (Rosa e cols., 1986). Trabalhando com macacos, Wilson (1971) e Fantel e cols. (1977) observaram, após a administração de tretinoína: microtia, hidrocefalia e disformia facial com micrognatia, além de retardo do crescimento. Newell-Morris e cols. (1980) e Hendrickx e cols. (1980) observaram, no macaco Rhesus tratado com tretinoína, numerosas malformações: microcefalia, hidrocefalia, anormalidades cranianas, hipoplasias do maxilar e da mandíbula, palato fissurado, orelhas pequenas, deformadas e de implantação baixa, exoftalmia, coloboma, transposição cardiovascular, ectrodactilia, sindactilia, atresia anal, amastia, hipoplasia tímica.

A isotretinoína é oito vezes mais teratogênica que o ácido retinóico no embrião de camundongo (Kochhar e cols., 1984). Com o uso clínico aumentado da isotretinoína (Accutane® - Roche) no tratamento de desordens da pele, acne cística refratária, rosácea e nas condições neoplásicas e pré-neoplásicas (Ward e cols., 1984), casos de gestações adversas começaram a ser relatados (Hall, 1984; Fernhoff & Lammer, 1984; Lott e cols., 1984). Numa revisão de Lammer e cols. (1985) de 154 casos de exposição de embriões humanos à isotretinoína, ficou demonstrada a teratogenicidade da droga em humanos.

Trabalhando com hamsters, Schenefelt (1971) produziu numerosas malformações quando da administração de tretinoína: microcefalia, espinha bifida, encefalocele, exencefalia, anormalidades cranianas, orelhas ausentes e deformadas, ouvidos médio e interno com anormalidades, exoftalmia, microftalmia, coloboma, aorta hipoplástica, extremidades curtas, ectrodactilia, atresias anal e uterina, além de hipoplasia do timo, rim, artéria umbilical, tireóide, bulbos olfatórios, onfalocele e ausência da vesícula biliar.

Estudando os análogos tetralin e indane tetrametilado do ácido retinóico, Howard e cols. (1987) observaram que tais drogas induziam o aparecimento de várias malformações em hamsters. Hassell e cols. (1978) observaram que os retinóides contendo um ou dois anéis aromáticos na sua cadeia lateral, eram os inibidores mais potentes da condrogênese fetal de ratos.

Em estudo de Contrera (1986) administrando em ratas prenhes uma única dose de 150.000 UI de vitamina A, sob a forma de palmitato, pelas vias digestiva e intraperitoneal, observou uma gama variada de malformações: exoftalmia uni ou bilateral com aplasia palpebral; falta de fusão e mesmo ausência dos tubérculos auriculares (anotia); fenda cervical, "*spina bifida*"; encurtamento dos membros anteriores (focomelia) e fusão dos membros posteriores (sirenídeos); agenesia de cauda; hidropsia; fetos mortos e reabsorções fetais; pele com descamação excessiva (envelhecimento fetal) e ausente em algumas regiões da cabeça e pescoço.

### 1.3 Vitamina A e Rins

Um dos primeiros relatos sobre hipervitaminose A no sistema urogenital, foi elaborado por Lewis e Reti (1934), onde descreveram que estudos histológicos haviam evidenciado a ocorrência de glomerulonefrose necrótica com focos calcificados. No mesmo ano, Davies e Moore também constataram um acúmulo de vitamina A nos rins e pulmões, além do fígado, tanto com a administração de doses moderadas como de altas doses de vitamina A.

Em 1935, Hale verificou que a carência de vitamina A provocava, no embrião de porcos, uma parada na migração dos rins, bem como sua fusão, dando-lhes um aspecto de ferradura. Resultados semelhantes foram obtidos nos embriões de ratos por Wilson e Warkany (1948) e por Roux, Fournier, Dupuis e Dupuis (1962). Em 1953, Wilson, Roth e Warkany observaram hidronefrose e hidroureter quando doses elevadas de vitamina A eram administradas entre os dias 10 e 15 da gestação, seguindo um período de carência.

Giroud, Martinet e Roux, em 1958, trabalhando com fetos de ratos, encontraram resultados importantes sobre a teratogenicidade da vitamina A. Os

pesquisadores, após a administração de 50.000 UI de vitamina A às ratas prenhes, observaram nos filhotes diminuição dos rins, com posição mais baixa do que os do controle. No entanto, o exame minucioso demonstrou que: os glomérulos possuíam a aparência normal, o que levava a crer que fossem funcionais. A hipoplasia renal não era marcante e as maiores diferenças foram observadas nas vias excretoras. Os ureteres tinham aspecto tortuoso e dilatado devido às obliterações tardias do ureter enquanto a atividade secretora do rim já havia começado. Os autores do trabalho fazem diversas considerações: no rato normal, a membrana uretral desaparece por volta do 20º dia. Se permanece por mais tempo, leva ao retardo da eliminação da urina e causa dilatação e atraso no desenvolvimento das vias urinárias, com união incompleta do ureter à bexiga, e hipoplasia da bexiga. Entretanto, estas anomalias são observadas em número significativo (40,2%) quando as ratas-mães são tratadas com doses excessivas de vitamina A do 8º até ao 10º dia de gestação.

Quando fetos de camundongos foram expostos à hipervitaminose A, Kalter e Warkany (1960-1961) observaram malformações urogenitais congênitas. Trabalhando com ratos em fase de lactação, Lopes (1973) observou nos rins: diminuição do tamanho dos glomérulos e acidofilia do citoplasma celular dos túbulos contorcidos proximais, além de diminuição das figuras mitóticas, quando as ratas-mães haviam recebido injeções diárias de 40.000 UI de palmitato de retinol durante a gestação.

Muito embora não se assuma que os resultados obtidos em animais experimentais tratados com doses excessivas de vitamina A possam ser extrapolados para humanos, vários efeitos tóxicos obtidos em experimentos podem servir como indicadores de ocorrências possíveis em casos clínicos (Hathcock e cols., 1990).

Em 1965, Pilotti e Scorta, descreveram uma ocorrência clínica de malformação congênita urogenital. A anamnese demonstrou que a mãe ingeriu 40.000 UI por dia de um preparado oral de vitamina A desde o 40º até o 70º dia de gestação. Além de anomalias ortopédicas, o neonato apresentou alterações cardiovasculares, que o levou à morte logo após o nascimento. A autópsia observou que os rins apareciam aumentados e deformados, com superfície áspera e granulosa. Os cortes no tecido permitiam visualizar parênquima intercalado com grânulos e ureteres tortuosos. Não havia também a inserção entre o ureter e a bexiga. Ao exame histológico, tanto nas camadas corticais como nas medulares dos

rins, foi observado a presença de cavidades de vários volumes, atapetadas de células cilíndricas, intercaladas com áreas que apresentam glomérulos renais de aparência normal.

Um outro interessante caso clínico foi descrito por Bernhardt e Dorsey (1974), onde apresentaram uma criança de dois meses de idade hospitalizada com perda de peso e estado cronicamente comprometido. Ao exame radiográfico constatou-se a presença de ureter esquerdo com inserção aberrante na vagina, resultando em ureteroccele que comprimia a uretra, agravando o malfuncionamento do rim esquerdo. Além disto, foi observado hidroureter bilateral e hidronefrose. Revendo a história familiar, notou-se que a mãe havia ingerido 25.000 UI por dia de vitamina A nos três primeiros meses, 50.000 UI por dia nos meses subsequentes da gestação, através de auto-medicação.

Bendich e Langseth (1989) ainda relatam um caso de malformação, onde são notados rins hipoplásicos de um neonato de 42 semanas, cuja mãe havia ingerido 150.000 UI de vitamina A durante os dias 19 a 40 da gestação para o tratamento de acne.

Segundo Giroud e cols. (1958), no homem, os ureteres migram para a região vesical, onde se ligam à bexiga, por volta dos dias 15 e 17 de vida intrauterina. A função renal inicia-se com 55 dias quando os glomérulos já apresentam o aspecto funcional. Aos 3 meses e meio o tecido renal é muito ativo e continua assim, participando da composição do líquido amniótico através da formação da urina.

#### 1.4 Proposição

Tendo em vista a vitamina A:

1. ser indispensável para o crescimento fetal normal e o desenvolvimento em muitas espécies animais (Wilson e cols., 1953; O'Toole e cols., 1974; Takahashi e cols., 1975);
2. estar envolvida no controle do crescimento e desenvolvimento da célula epitelial normal (Wolback & Howe, 1925 e 1928);
3. possuir derivados metabólicos, principalmente a isotretinoína que tem apresentado efeitos teratogênicos em humanos (Hall, 1984; Fernhoff & Lammer, 1984; Lott e cols., 1984; Lammer e cols., 1985) e
4. quando administrada em excesso, induzir alterações renais (Kalter & Warkany, 1960 e 1961; Piloti & Scorta, 1965; Bernhardt & Dorsey, 1974; Bendich & Langseth, 1989).

O presente trabalho de pesquisa foi planejado com os seguintes objetivos:

1. caracterizar, ponderalmente, as alterações ocorridas nos fetos de ratos e nos rins destes, cujas mães foram submetidas à hipervitaminose A e
2. analisar, cariométricamente, os núcleos das células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais e distais e da alça de Henle, após a administração de diferentes doses de vitamina A.

## **2 Material e Métodos**

## 2.1 Determinação do primeiro dia de prenhez

Com a finalidade de determinar com precisão o primeiro dia de prenhez das ratas, estas foram acasaladas com os machos durante a noite e, pela manhã, foram feitos esfregaços vaginais, visando verificar a presença de espermatozóides na vagina. Quando isto ocorria, considerava-se este dia como primeiro dia de prenhez.

As ratas do Biotério Central da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas receberam ração comercial (labina C) e água "*ad libitum*", durante todo o período experimental, tendo sido mantidas em gaiolas individuais.

## 2.2 Material

Do acasalamento de ratas (*Ratus norvegicus albinus*, variedade Wistar) foram obtidos fetos, dos quais foram separados 42 para o grupo tratado, filhos de ratas que receberam no 10º dia de prenhez, uma única injeção intraperitoneal de 30.000, 40.000, 50.000, 70.000, 100.000 ou 150.000 UI de vitamina A (Arovit ® – Produtos Roche), sob

a forma de palmitato de retinil e em solução coloidal hidromissível. Outros 7 fetos foram obtidos de mães que receberam solução salina no 10<sup>o</sup> dia de prenhez, constituindo o grupo controle.

### **2.3 Técnica de Dissecção e Pesagem**

No 21<sup>o</sup> dia de prenhez, as ratas foram sacrificadas por inalação de éter sulfúrico. Através de uma incisão ampla no abdômen e útero das mesmas, os fetos foram expostos e posteriormente coletados. Dos 42 fetos separados aleatoriamente, cada 7 pertenciam a uma mãe que recebera uma dose diferente de vitamina A. Foram separados, também, 7 fetos do grupo controle.

A fixação destes fetos foi feita durante 24 horas em solução de Alfac: álcool 80% (85ml), formalina (10ml) e ácido acético (5ml). Após a fixação, os animais foram secados em papel de filtro e pesados em balança de precisão Mettler.

Os rins dos diversos fetos (42 do grupo tratado e 7 do grupo controle), foram pesados em balança de precisão Mettler. Foram pesadas, também, as placentas (em miligramas) e medidos os comprimentos dos cordões umbilicais (em centímetros).

### **2.4 Técnicas Histológicas**

Os rins de todos os animais foram desidratados em álcool, numa série crescente de graduações em benzol e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados com 7 micrômetros de espessura e os cortes foram corados pela hematoxilina-cosina (HE) para observação ao microscópio de luz.

### **2.5 Técnica Morfométrica**

#### **2.5.1 Cariometria**

Os volumes reais dos núcleos dos túbulos contorcidos proximais, distais e alças de Henle, dos diversos grupos experimentais foram obtidos através de

medidas cariométricas.

Os cortes foram focalizados ao microscópio óptico, com objetiva de imersão (100x), ao qual era adaptada uma câmara clara (Olimpus).

Os núcleos dos túbulos renais (túbulos proximais, distais e alça de Henle) foram projetados sobre papel, com um aumento final de 1140x. As imagens obtidas, em número de 50 para cada animal dos grupos estudados, foram contornados com lápis número 2, tomando-se o cuidado de considerar somente as imagens elípticas dos núcleos. Para a obtenção dos volumes, os eixos maior e menor foram medidos obtendo-se ainda, por meio da média geométrica dos 2 primeiros, um terceiro eixo. Em seguida, foi aplicada a fórmula do volume elipsóide de acordo com Valeri & cols. (1967):

$$V = \frac{\pi}{6} \times D_1 \times D_2 \times \sqrt{D_1 \times D_2}$$

onde  $D_1$  e  $D_2$  representam os eixos maior e menor, respectivamente.

### 2.5.2 Cálculo da Constante para a equação do volume elipsóide, quando a ampliação é de 1140x.

A equação matemática do volume do elipsóide é:

$$V = \frac{4\pi abc}{3}$$

em que a, b e c são os três semi-eixos do sólido. Se quiséssemos escrever a equação em termos de eixos, e não de semi-eixos, teríamos:

$$V = \frac{4}{3} \times \pi \times \frac{D_1}{2} \times \frac{D_2}{2} \times \frac{D_3}{2}$$

$$V = \frac{\pi}{6} \times D_1 \times D_2 \times D_3$$

No caso do núcleo de uma célula, que é observado em duas dimensões, apenas o terceiro eixo pode ser estimado como a média geométrica dos outros dois.

Temos assim:

$$V = \frac{\pi}{6} \times D_1 \times D_2 \times \sqrt{D_1 \times D_2}$$

D indica o comprimento real dos eixos em micrômetros. Como o valor medido na projeção é feito em milímetros, o valor D valerá 1000x menos que este valor em milímetros. Por sua vez, o valor 1000D será ampliado 1140x, razão pela qual é preciso dividi-lo por 1140 para ter-se o valor real do eixo. Assim temos:

$$V = \frac{\pi}{6} \times \frac{1000D_1}{1140} \times \frac{1000D_2}{1140} \sqrt{\frac{1000D_1 \times 1000D_2}{1140}}$$

Efetuando-se as operações aritméticas indicadas, tem-se:

$$V = 0,35341426 \times D_1 \times D_2 \times \sqrt{D_1 \times D_2}$$

## 2.6 Técnicas Estatísticas

Com o objetivo de se comparar as amostras dos pesos corporais dos fetos controles e tratados, e pesos dos rins e placentas, bem como as medidas dos cordões umbilicais, empregou-se a análise de variância.

Para o estudo dos dados cariométricos empregou-se o teste não-paramétrico da mediana.

### 2.6.1 Teste da Mediana (Siegel, 1956)

Nos casos em que se desconhece a distribuição das populações das quais provêm as amostras, a comparação das medianas destas amostras se aplica com maior sucesso que a comparação das médias.

Esse teste permite concluir se duas amostras provêm de populações que têm a mesma mediana.

O procedimento prático consiste em ordenar, conjuntamente, os valores das duas amostras, de maneira a obter o valor central (mediana) correspondente a todos os dados da amostragem.

A seguir constrói-se um quadro como o que se segue:

	Amostra 1	Amostra 2	Total
Valores menores que a mediana	A	B	A + B
Valores iguais ou maiores que a mediana	C	D	C + D
Total	A + C	B + D	N = A + B + C + D

Construindo-se o quadro, a aplicação do teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) permite decidir quanto à aceitação de  $H_0$ , que admite serem as duas amostras

provenientes de populações de mesma mediana.

A variável  $\chi^2$  é calculada pela fórmula:

$$\chi^2 = \frac{N(AD - BC - \frac{N}{2})^2}{(A + B)(C + D)(A + C)(B + D)}$$

Estabelecendo \*, que neste trabalho foi tomado a um nível de 95% (\* = 0,05), e com um grau de liberdade, obtém-se o valor de  $\chi^2$  tabelado.

A hipótese  $H_0$  é rejeitada sempre que o valor calculado de  $\chi^2$  for maior ou igual ao seu valor tabelado.

### **3 Resultados**

### **3.1 Resultados Morfológicos**

#### **3.1.1 Peso Corporal**

Os pesos corporais dos fetos tratados com diferentes doses de vitamina A foram menores (2,80; 2,55; 2,55; 2,55; 2,46 e 2,58 gramas, respectivamente para 30.000; 40.000; 50.000; 70.000; 100.000 e 150.000 UI) que os pesos corporais dos fetos do grupo controle (5,07 gramas) (Tabela 1).

O teste da análise de variância acusou diferença estatisticamente significativa entre as comparações (Tabela 2).

O ganho de peso das ratas que receberam a vitamina A durante a prenhez foi menor que o das fêmeas do grupo controle.

**Tabela 1** – Pesos corporais (g) dos fetos controles e submetidos à hipervitaminose A e suas respectivas médias.

Hipervitaminose A						
Controle	30.000 UI	40.000 UI	50.000 UI	70.000 UI	100.000 UI	150.000 UI
4,35	2,89	2,17	2,16	2,12	2,13	2,29
5,12	2,90	2,10	2,21	2,01	2,33	2,32
5,44	2,05	2,27	2,30	2,94	2,19	2,36
5,24	2,95	2,95	2,22	2,82	2,31	2,81
5,05	2,93	2,99	2,17	2,79	2,89	2,99
5,29	2,84	2,64	2,21	2,61	2,64	2,94
5,01	3,05	2,70	2,34	2,54	2,71	2,36
5,07 ± 0,35	2,80 ± 0,34	2,55 ± 0,37	2,23 ± 0,07	2,55 ± 0,36	2,46 ± 0,29	2,58 ± 0,32

**Tabela 2** – Análise de variância dos pesos corporais dos animais estudados

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	6	40,0451624	6,6741937	68,0095 *
Resíduo	42	4,1217196	0,0981362	
Total	48	44,1668820		

\* estatisticamente significativa ao nível de 5%

### 3.1.2 Peso da Placenta

O peso médio das placentas (490,80 mg) dos fetos tratados com 30.000 UI de vitamina A foi menor que o dos fetos controle (594,50 mg). O mesmo pode-se verificar em relação às demais dosagens, a saber: 40.000 UI (472,80 mg), 50.000 UI (459,83 mg), 70.000 UI (505,43 mg), 100.000 UI (461,54 mg) e 150.000 UI (470,53 mg) (Tabela 3).

O teste da análise de variância acusou diferença estatisticamente significativa entre as comparações (Tabela 4).

**Tabela 3** – Pesos das placentas (mg) dos fetos controles e submetidos à hipervitaminose A e suas respectivas médias.

Hipervitaminose A						
Controle	30.000 UI	40.000 UI	50.000 UI	70.000 UI	100.000 UI	150.000 UI
569,2	491,2	524,7	464,9	547,6	449,1	459,8
582,3	432,9	448,1	528,7	491,6	439,3	452,7
552,9	521,3	498,2	491,3	499,4	505,1	504,0
650,7	512,7	535,2	498,7	409,8	407,3	556,5
659,2	519,7	491,3	398,6	567,3	403,1	402,3
574,9	464,5	399,4	409,7	521,1	539,7	427,1
572,3	493,6	412,7	426,9	501,2	487,2	491,3
594,50 ± 42,31	490,80 ± 32,46	472,80 ± 53,52	459,83 ± 49,36	505,43 ± 50,40	461,54 ± 51,11	470,53 ± 51,51

**Tabela 4 –** Análise de variância dos pesos placentários dos animais estudados

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	6	94230,5620502	15705,0936750	6,8930 *
Resíduo	42	95693,7204564	2278,4219156	
Total	48	189924,2825066		

\* estatisticamente significativo ao nível de 5%

### 3.1.3 Comprimento do Cordão Umbilical

O comprimento médio dos cordões umbilicais dos fetos controle (2,39 cm) foi maior quando comparado ao comprimento médio dos cordões umbilicais obtidos com doses de 30.000 UI (2,01 cm), 40.000 UI (2,19 cm), 50.000 UI (2,13 cm), 70.000 UI (2,00 cm), 100.000 UI (1,90 cm) e 150.000 UI (1,84 cm) conforme demonstra a Tabela 5.

O teste da análise de variância acusou diferença estatisticamente significativa entre as comparações (Tabela 6).

### 3.1.4 Peso do Rim

Os pesos dos rins dos fetos de ratos estão demonstrados na Tabela 7. Observa-se que houve um aumento ponderal quando se analisa o grupo administrado com a dose de 30.000 UI (5,86 mg) em relação ao controle (5,10 mg). No entanto, com o aumento da dose de vitamina A (40.000 UI, 5,07 mg; 50.000 UI, 4,89 mg; 70.000 UI, 4,50 mg; 100.000 UI, 3,29 mg e 150.000 UI, 3,41 mg) observa-se uma hipoplasia renal.

O teste da análise de variância acusou diferença estatisticamente significativa entre as comparações (Tabela 8).

**Tabela 5** – Comprimentos dos cordões umbilicais (cm) dos fetos controles e submetidos à hipervitaminose A e suas respectivas médias.

Hipervitaminose A						
Controle	30.000 UI	40.000 UI	50.000 UI	70.000 UI	100.000 UI	150.000 UI
2,3	1,9	2,3	2,0	2,2	1,7	1,8
2,7	2,1	2,0	2,1	2,1	1,9	2,0
2,1	2,0	2,2	1,9	1,9	2,1	1,7
2,3	2,0	2,2	2,0	1,9	2,0	1,6
2,4	2,1	2,2	2,3	1,8	1,9	1,8
2,4	1,9	2,3	2,6	2,0	1,9	1,9
2,1	2,1	2,1	2,0	2,1	1,8	2,1
2,39 ± 0,27	2,01 ± 0,09	2,19 ± 0,11	2,13 ± 0,24	2,00 ± 0,14	1,90 ± 0,13	1,94 ± 0,17

**Tabela 6** – Análise de variância das medidas dos cordões umbilicais dos animais estudados

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	6	1,4338701	0,2389783	7,6203 *
Resíduo	42	1,3171502	0,0313607	
Total	48	2,7510203		

\* estatisticamente significativa ao nível de 5%

**Tabela 7** – Pesos dos rins (mg) dos fetos controles e submetidos à hipervitaminose A e suas respectivas médias.

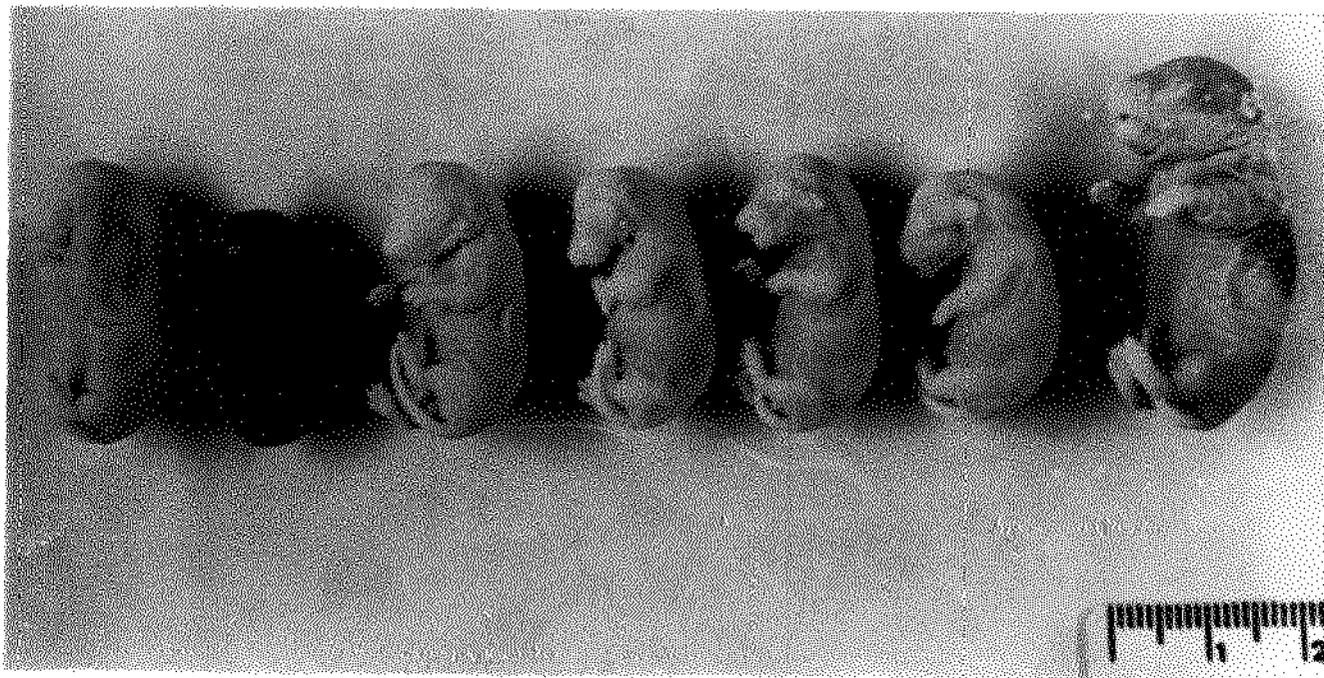
Hipervitaminose A						
Controle	30.000 UI	40.000 UI	50.000 UI	70.000 UI	100.000 UI	150.000 UI
5,05	5,30	4,70	4,55	5,75	3,25	3,55
5,55	5,90	4,50	5,10	4,60	3,55	3,85
5,00	5,95	5,03	5,05	4,55	3,35	3,70
4,80	6,15	5,35	5,65	4,15	3,05	3,25
5,10	6,15	5,30	4,60	4,35	3,31	3,05
5,25	6,50	5,25	4,60	4,00	3,30	3,25
4,95	5,05	5,35	4,70	4,10	3,20	3,25
5,10 ± 0,24	5,86 ± 0,51	5,07 ± 0,34	4,89 ± 0,40	4,50 ± 0,60	3,29 ± 0,15	3,41 ± 0,29

**Tabela 8** – Análise de variância dos pesos dos rins dos animais estudados

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	6	36,9656311	6,1609385	40,7450 *
Resíduo	42	6,3506979	0,1512071	
Total	48	43,3163290		

\* estatisticamente significativa ao nível de 5%

### 3.1.5 Anomalias Congênitas Causadas por Hipervitaminose A



**Figura 1** – Aspecto macroscópico de um feto de cada grupo estudado. Da direita para a esquerda: controle; tratados com 30.000, 40.000, 50.000, 70.000, 100.000 e 150.000 UI de vitamina A.

O exame macroscópico dos fetos hipervitaminóticos revelou as seguintes malformações: exoftalmia uni ou bilateral com aplasia palpebral, que apareceu desde a dose mais baixa de vitamina A administrada nesses animais, embora nem todos a tenham apresentado. A partir de 40.000 UI de vitamina A, os problemas oculares foram cada vez mais frequentes, culminando com a exoftalmia associada à opacificação da córnea na quase totalidade dos fetos que receberam a dosagens mais altas da vitamina. A partir de 70.000 UI de vitamina A foi comum observar falta de fusão, ou mesmo ausência dos tubérculos auriculares (anotia), e, alguns casos de anencefalia, macrostomia, micro e macroglossia, protusão da língua e língua bífida, "*spina bifida*" e hidropsia. Foram observados ainda, ossos mandibular e maxilar mais curtos, encurtamento dos membros anteriores (focomelia), além da falta de ossificação em várias regiões como a cabeça e as vértebras. Ainda observou-se hepatomegalia evidente e foram notados casos de reabsorção fetal.

## 3.2 Resultados Morfométricos

### 3.2.1 Cariometria

**Tabela 9** – Volumes nucleares médios, em micrômetros cúbicos, das células dos túbulos proximais, distais e alça de Henle dos rins dos fetos de ratos submetidos às várias doses de vitamina A

Hipervitaminose A							
Tub	Controle	30.000 UI	40.000 UI	50.000 UI	70.000 UI	100.000 UI	150.000 UI
P r o x i m a l	23,76	23,27	34,26	29,30	29,58	29,72	30,61
	25,40	25,27	33,30	31,21	29,49	28,90	29,68
	32,38	38,12	25,07	31,20	27,57	55,94	27,97
	30,18	24,91	33,60	26,85	26,81	38,48	29,21
	36,55	32,11	30,69	36,75	30,06	39,57	20,29
	23,72	28,17	26,78	35,01	21,23	31,84	33,80
	32,29	34,59	21,77	31,31	30,24	36,30	37,07
D i s t a l	29,14	23,14	27,40	39,64	48,69	32,93	33,56
	29,58	27,16	40,15	27,65	39,44	45,18	38,24
	37,05	27,94	34,68	26,46	26,91	32,84	39,42
	33,91	27,02	45,47	35,55	30,59	32,71	30,55
	27,13	40,46	26,66	36,65	32,11	39,69	33,86
	24,78	30,85	20,73	38,27	35,33	31,91	42,88
	29,81	32,34	35,32	30,05	36,14	39,55	30,27
A l ç a  d e  H e n l e	35,29	24,51	24,23	44,44	46,69	44,44	30,20
	27,91	18,60	36,08	28,12	25,89	34,55	34,51
	32,91	38,35	31,05	23,70	34,38	37,69	32,85
	41,51	27,49	37,93	23,67	28,64	32,88	33,32
	28,38	36,63	28,91	43,18	34,35	38,24	33,03
	16,65	38,13	22,69	45,57	26,16	38,57	40,25
	29,04	36,93	29,60	21,36	35,08	28,50	42,62

A partir dos dados originais, obtidos por meio da cariometria, elaborou-se a Tabela 9, que relaciona os volumes nucleares médios. Cada valor dessa tabela corresponde à média de 50 volumes nucleares, calculados pelos respectivos diâmetros médios dos núcleos, para cada animal, para cada epitélio dos diversos túbulos renais, nos sete grupos de estudo (controle e tratados pelas diversas dosagens de vitamina).

Por sua vez, a partir dos valores da Tabela 9 construiu-se a Tabela 10, que relaciona as médias gerais de cada interação região x tratamento, bem como os respectivos desvios padrões das médias.

Os dados originais foram usados diretamente para a confecção dos gráficos de distribuição de frequências dos volumes nucleares e para o teste não-paramétrico da mediana.

**Tabela 10** – Volumes nucleares das células dos túbulos proximais e distais e alça de Henle dos rins dos animais estudados, expressos em médias  $\pm$  desvios padrão das médias

Grupo	Túbulo Proximal	Túbulo Distal	Alça de Henle
Controle	29,18 $\pm$ 4,98	30,20 $\pm$ 4,11	30,24 $\pm$ 7,69
30.000 UI	29,49 $\pm$ 5,58	29,84 $\pm$ 5,33	31,52 $\pm$ 7,94
40.000 UI	29,35 $\pm$ 4,87	32,92 $\pm$ 8,53	30,07 $\pm$ 5,61
50.000 UI	31,66 $\pm$ 3,33	33,47 $\pm$ 5,33	32,82 $\pm$ 11,04
70.000 UI	27,85 $\pm$ 3,20	35,60 $\pm$ 7,06	33,04 $\pm$ 7,21
100.000 UI	37,25 $\pm$ 9,24	36,40 $\pm$ 5,10	36,41 $\pm$ 5,04
150.000 UI	29,80 $\pm$ 5,22	35,54 $\pm$ 4,75	35,25 $\pm$ 4,47

### a) Túbulos proximais

As médias gerais dos volumes nucleares das células da camada basal do epitélio renal, em sua região dos túbulos proximais, conforme se pode verificar na Tabela 10, acusaram um valor igual a  $29,18 \mu\text{m}^3$  para os fetos controles e um valor de  $29,49 \mu\text{m}^3$  para os fetos tratados com 30.000 UI de vitamina A intraperitonealmente. Uma vez construído o histograma de frequência (Figura 2) pela transformação logarítmica dos dados, constatou-se não haver um deslocamento da mediana de distribuição de volumes nucleares das células dos fetos tratados com vitamina A, em relação aos controles. O teste da mediana (Tabela 11) não acusou um deslocamento estatisticamente significativo, ao se comparar o valor obtido para o  $\chi^2$  frente ao valor tabelado (3,84).

Consultando-se novamente a Tabela 10, constatou-se que o volume médio das células da região tubular proximal foi igual a  $29,35 \mu\text{m}^3$  para o feto tratado com 40.000 UI de vitamina A. A análise do histograma de frequência desses volumes nucleares (Figura 3) também não revelou um deslocamento da mediana dos dados referentes aos animais tratados, o que foi confirmado pelo teste da mediana (Tabela 12).

Analisando-se ainda a Tabela 10, verificou-se que os volumes das células dos túbulos proximais dos fetos tratados com 50.000 UI, 70.000 UI e 150.000 UI foram iguais, respectivamente, a  $31,66 \mu\text{m}^3$ ,  $27,85 \mu\text{m}^3$  e  $29,80 \mu\text{m}^3$ . A análise dos histogramas de frequência dos volumes nucleares (Figuras 4, 5 e 7) não revelou deslocamento da mediana de distribuição dos volumes nucleares das células dos fetos tratados. Tais resultados foram confirmados pelo teste da mediana aplicado (Tabelas 13, 14 e 16). No entanto, quando se analisa o grupo controle frente ao grupo administrado com a dose de 100.000 UI de vitamina A, observa-se um deslocamento à direita da mediana (Figura 6) que indica um aumento volumétrico dos núcleos dos animais tratados, confirmado pelo teste da mediana (Tabela 15), de acordo com os resultados experimentais expressos na Tabela 10 ( $37,25 \mu\text{m}^3$ ).

Os histogramas de frequência dos volumes nucleares dos túbulos proximais renais dos fetos tratados com 30.000 UI em relação às demais dosagens, revelaram um deslocamento à direita da mediana de distribuição dos volumes nucleares dos fetos tratados com 50.000 UI e 100.000 UI (Figuras 9 e 11) confirmados pelas tabelas 18 e 20. Com

relação às outras dosagens não foi constatado desvio da mediana (Figuras 8, 10 e 12). Tais resultados foram confirmados pelo teste da mediana aplicado (Tabelas 17, 19 e 21).

Quando foram comparados os histogramas de frequência dos volumes nucleares dos túbulos proximais dos fetos tratados com 40.000 UI de vitamina A e dos demais animais tratados com as diversas dosagens, constatou-se haver um deslocamento à direita da mediana de distribuição dos volumes nucleares dos fetos tratados com 100.000 UI da droga (Figura 15). Não foram observados desvios nos fetos tratados com 50.000 UI, 70.000 UI e 150.000 UI, em relação aos tratados com 40.000 UI de vitamina A (Figuras 13, 14 e 16). Tais resultados foram confirmados pelo teste da mediana aplicado (Tabelas 22, 23, 24 e 25).

A comparação entre o histograma de frequência dos volumes nucleares dos fetos tratados com 50.000 UI de vitamina A e os fetos tratados com 70.000 UI, 100.000 UI e 150.000 UI (Figuras 17, 18 e 19) revelou um deslocamento à direita da mediana dos volumes nucleares dos fetos tratados com essas dosagens. Tais resultados foram confirmados pelo teste da mediana aplicado (Tabelas 26, 27 e 28).

Quando foram comparados os histogramas de frequência dos volumes nucleares do epitélio dos túbulos proximais dos rins dos fetos tratados com 70.000 UI em relação aos tratados com 100.000 UI de vitamina A, observou-se um deslocamento à direita (Figura 20) que foi confirmado pelo teste da mediana (Tabela 29). No entanto, não se observou qualquer deslocamento da mediana quando se analisou este grupo frente aos tratados com 150.000 UI de vitamina A (Figura 21, Tabela 30).

A comparação entre os fetos tratados com 100.000 UI e 150.000 UI de vitamina A (Figura 22) mostrou um desvio à direita entre os grupos. Tais resultados foram confirmados pelo teste da mediana aplicado (Tabela 31).

#### **b) Túbulos distais**

As médias gerais dos volumes nucleares das células dos túbulos distais (Tabela 10) acusaram um valor igual a  $30,20 \mu\text{m}^3$  para os fetos controles e valores iguais a  $36,40 \mu\text{m}^3$  e  $35,24 \mu\text{m}^3$  para os fetos tratados, respectivamente com 100.000 UI e 150.000 UI de vitamina A. Essas diferenças ficam evidentes nas Figuras 27 e 28, nas quais estão

representadas as frequências absolutas dos volumes nucleares. Nesses histogramas, observa-se nitidamente, que há um deslocamento à direita do eixo central da distribuição dos volumes nucleares dos fetos tratados com vitamina A, deslocamentos esses estatisticamente significantes, conforme demonstrado pelo teste da mediana (Tabelas 36 e 37). O volume nuclear médio dos fetos tratados com 30.000 UI, 40.000 UI, 50.000 UI e 70.000 UI foram  $29,84 \mu\text{m}^3$ ;  $32,92 \mu\text{m}^3$ ;  $33,47 \mu\text{m}^3$  e  $35,60 \mu\text{m}^3$ , respectivamente, semelhantes aos controles (Tabela 10), ou seja, apresentaram valores estatisticamente semelhantes (Figuras 23, 24, 25 e 26 e Tabelas 32, 33, 34 e 35).

Comparando-se os histogramas de frequência dos volumes nucleares dos túbulos distais dos fetos tratados com 30.000 UI de vitamina A, com os demais animais tratados com as diversas dosagens da droga, observou-se haver um deslocamento à direita dos eixos centrais da distribuição dos volumes nucleares dos fetos tratados (Figuras 29, 30, 31, 32 e 33), deslocamentos esses estatisticamente significantes, conforme demonstrado pelos testes das medianas (Tabelas 38, 39, 40, 41 e 42).

Quando foram comparados os histogramas de frequência absoluta dos volumes nucleares dos túbulos distais dos rins dos fetos tratados com 40.000 UI de vitamina A com os demais fetos tratados com 50.000 UI e 70.000 UI da droga, observou-se um alinhamento entre as duas distribuições (Figuras 34 e 35), semelhança que foi confirmada pelo teste da mediana (Tabelas 43 e 44). Observando-se as Figuras 36 e 37, constatou-se haver um deslocamento à direita da mediana dos volumes nucleares dos fetos tratados com 100.000 UI e 150.000 UI de vitamina A, fato esse comprovado ser estatisticamente relevante (Tabelas 45 e 46).

Da comparação dos histogramas de frequência dos volumes nucleares dos túbulos distais dos fetos tratados com 50.000 UI de vitamina A e tratados com 70.000 UI e 100.000 UI (Figuras 38 e 39), observou-se um alinhamento entre as distribuições, semelhanças essas que foram confirmadas pelo teste da mediana (Tabelas 47 e 48). Ao se observar a comparação entre as doses de 50.000 UI e 150.000 UI da droga administrada aos fetos (Figura 40), obteve-se diferença estatisticamente significativa confirmada pelo teste não-paramétrico (Tabela 49).

Quando foram comparados os resultados dos fetos tratados com 70.000 UI de vitamina A, em relação aos tratados com 100.000 UI e 150.000 UI (Figuras

41 e 42), constatou-se um alinhamento, confirmado pelo teste da mediana (Tabelas 50 e 51).

Comparando-se os histogramas dos fetos tratados com 100.000 UI em relação aos tratados com 150.000 UI de vitamina A, não se observou qualquer deslocamento da mediana (Figura 43 e Tabela 52).

### c) Alça de Henle

As médias gerais dos volumes nucleares das células das alças de Henle de rins de fetos de ratos, conforme se pode verificar pela Tabela 10, acusaram um valor igual a  $30,24 \mu\text{m}^3$  para os fetos controles e valores de  $31,52 \mu\text{m}^3$ ;  $30,07 \mu\text{m}^3$ ;  $32,82 \mu\text{m}^3$ ;  $33,04 \mu\text{m}^3$ ;  $36,41 \mu\text{m}^3$  e  $35,25 \mu\text{m}^3$  para os fetos tratados, respectivamente com 30.000 UI, 40.000 UI, 50.000 UI, 70.000 UI, 100.000 UI e 150.000 UI de vitamina A intraperitonealmente. Uma vez construídos os histogramas de frequência (Figuras 44, 45, 46 e 47), constatou-se haver um alinhamento entre as distribuições para 30.000 UI, 40.000 UI, 50.000 UI e 70.000 UI, semelhança essa que foi confirmada pelo teste da mediana (Tabelas 53, 54, 55 e 56). Entretanto, quando foram comparados os histogramas dos fetos tratados com 100.000 UI de vitamina A e tratados com 150.000 UI, frente aos controles, observou-se um deslocamento à direita da mediana de distribuição dos volumes nucleares destes últimos (Figuras 48 e 49), confirmado com a aplicação do teste não-paramétrico (Tabelas 57 e 58).

Comparando-se os histogramas referentes aos fetos tratados com 30.000 UI frente aos tratados com 40.000 UI, 50.000 UI, 70.000 UI e 150.000 UI (Figuras 50, 51, 52 e 54), observou-se um alinhamento entre as distribuições, semelhança essa que foi confirmada pelo teste da mediana (Tabelas 59, 60, 61 e 63). Entretanto, quando foram comparados os histogramas dos fetos tratados com 30.000 UI de vitamina A e tratados com 100.000 UI, observou-se um deslocamento à direita da mediana de distribuição dos volumes nucleares destes últimos (Figura 53), confirmado com a aplicação do teste não-paramétrico (Tabela 62).

Quando foram comparados os histogramas de frequência dos volumes nucleares das células que compõem as alças de Henle de fetos tratados com 40.000 UI de vitamina A e os tratados com 50.000 UI e 70.000 UI da droga, não se observou diferença

estatisticamente significante (Figuras 55 e 56 e Tabelas 64 e 65). Entretanto, da comparação dos histogramas dos volumes nucleares dos fetos tratados com 40.000 UI de vitamina A e os tratados com 100.000 UI e 150.000 UI da droga (Figuras 57 e 58) constatou-se haver um deslocamento à direita da mediana, fato esse confirmado pelo teste da mediana (Tabelas 66 e 67).

Um deslocamento à direita da mediana de distribuição dos volumes nucleares dos fetos tratados com 50.000 UI da droga (Figuras 60 e 61), em relação aos tratados com 100.000 UI e 150.000 UI foi observado após a análise dos histogramas. Tais resultados foram confirmados pelo teste da mediana aplicado (Tabelas 69 e 70). No entanto, observou-se um alinhamento entre as representações dos tratados com 50.000 UI e 70.000 UI de vitamina A (Figura 59 e Tabela 68).

Um deslocamento significativo à direita da mediana, foi observado quando foram comparadas as frequências absolutas dos volumes das células das alças de Henle dos rins de fetos de ratos tratados com 70.000 UI e tratados com 100.000 UI e 150.000 UI de vitamina A (Figuras 62 e 63 e Tabelas 71 e 72).

Quando foram comparados os histogramas dos fetos tratados com 100.000 UI de vitamina A e os tratados com 150.000 UI, observou-se um deslocamento à direita da mediana (Figura 64). A Tabela 73 demonstra que o teste não-paramétrico da mediana comprovou estes resultados estatisticamente significantes.

### Rim de feto de rato - Túbulo Proximal

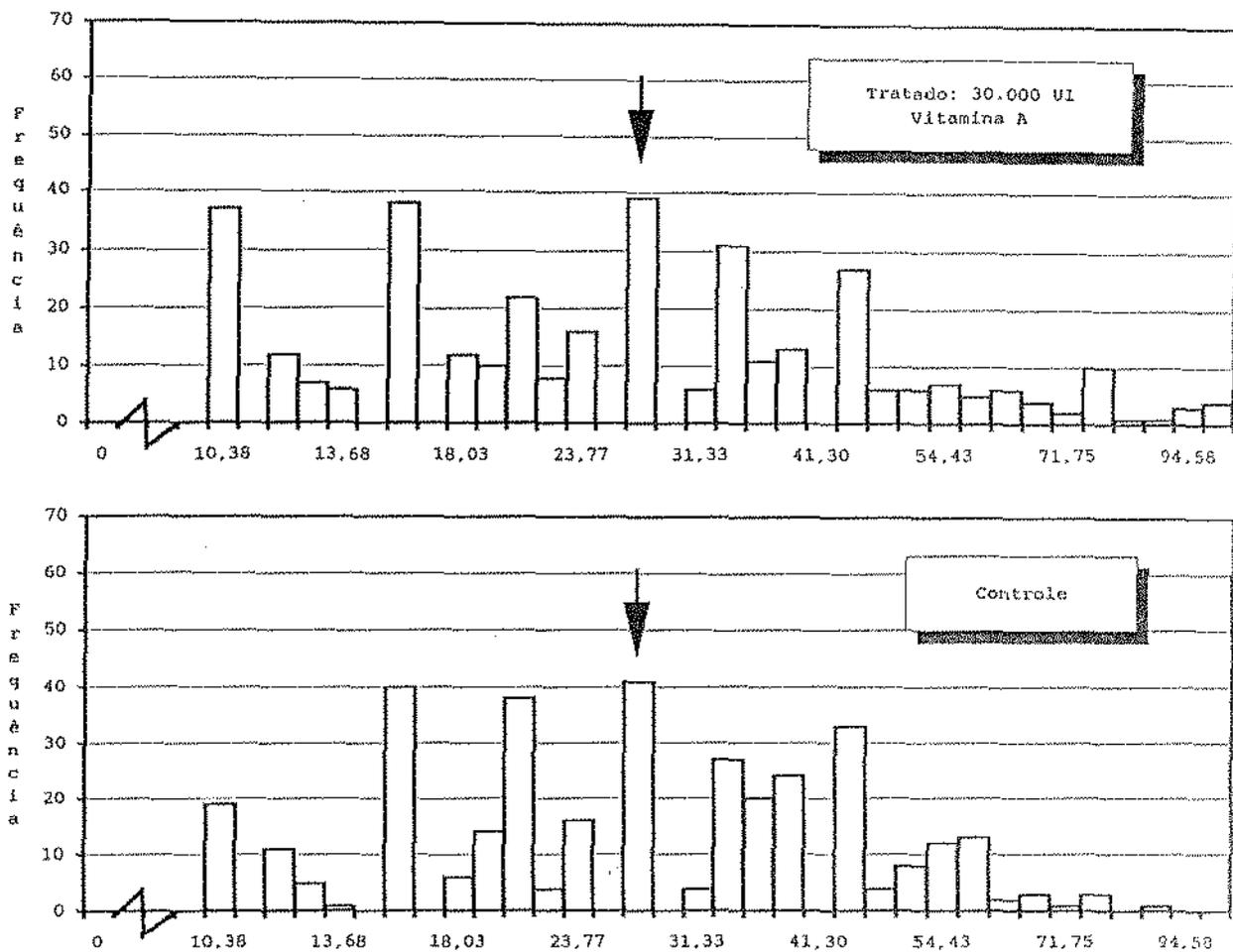


Figura 2 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 11 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	30.000 UI	Total
Menores que a mediana	154	168	322
Maiores ou iguais a mediana	196	182	378
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 1,29399586$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Proximal

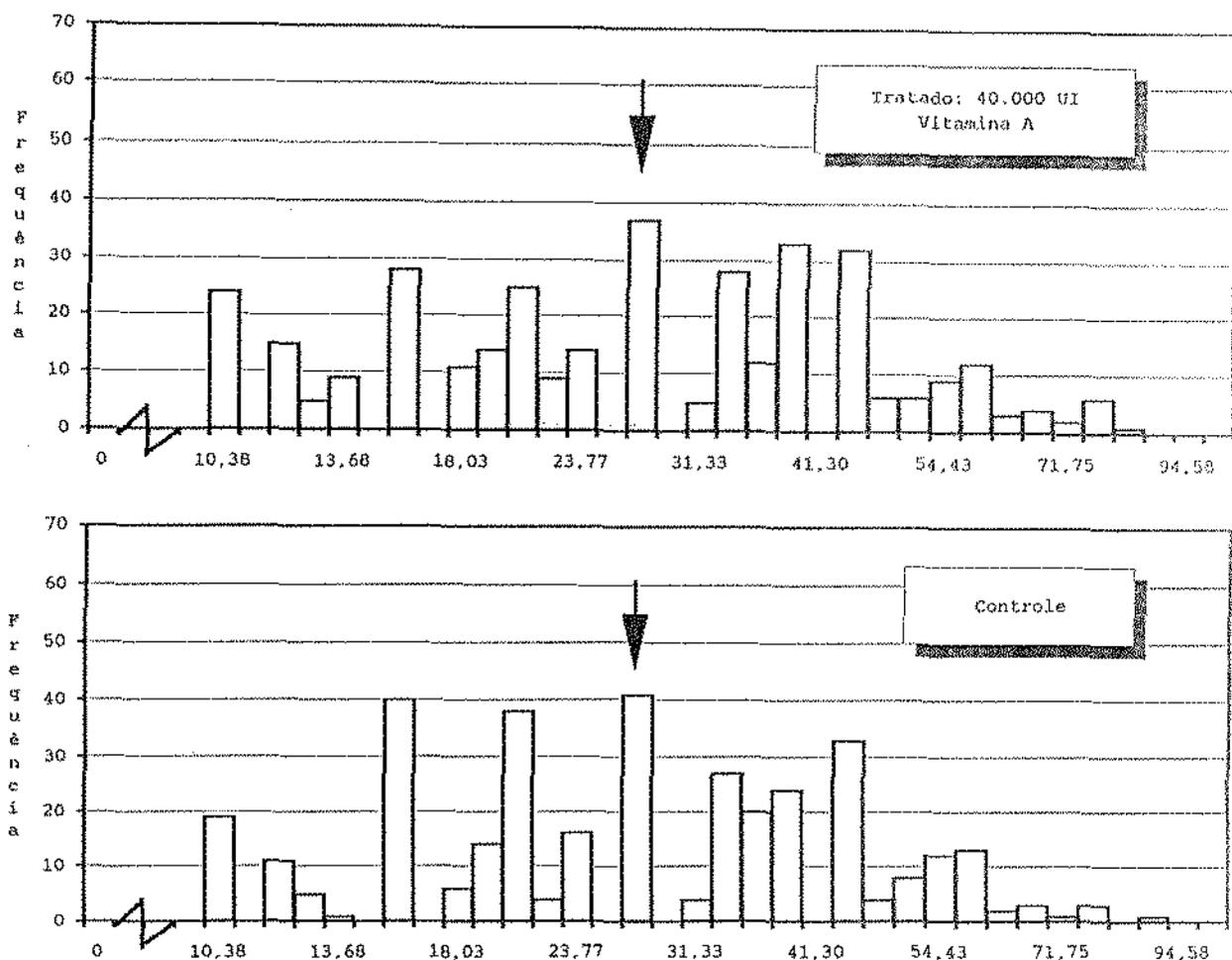


Figura 3 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 12 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	40.000 UI	Total
Menores que a mediana	154	154	308
Maiores ou iguais a mediana	196	196	392
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 0,00579777$			

## Rim de feto de rato – Túbulo Proximal

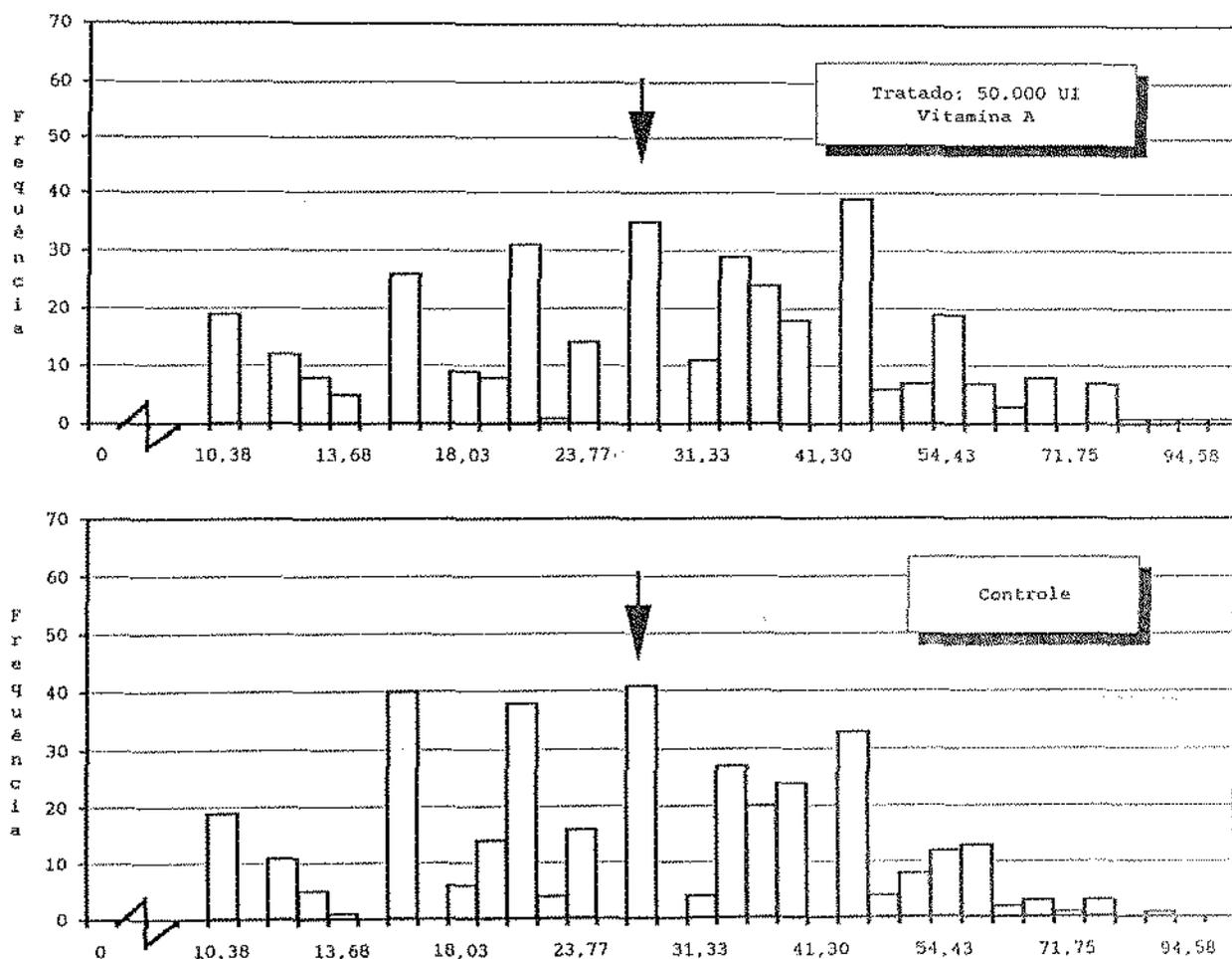


Figura 4 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 13 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	50.000 UI	Total
Menores que a mediana	154	133	287
Maiores ou iguais a mediana	196	217	413
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 2,36225123$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Proximal

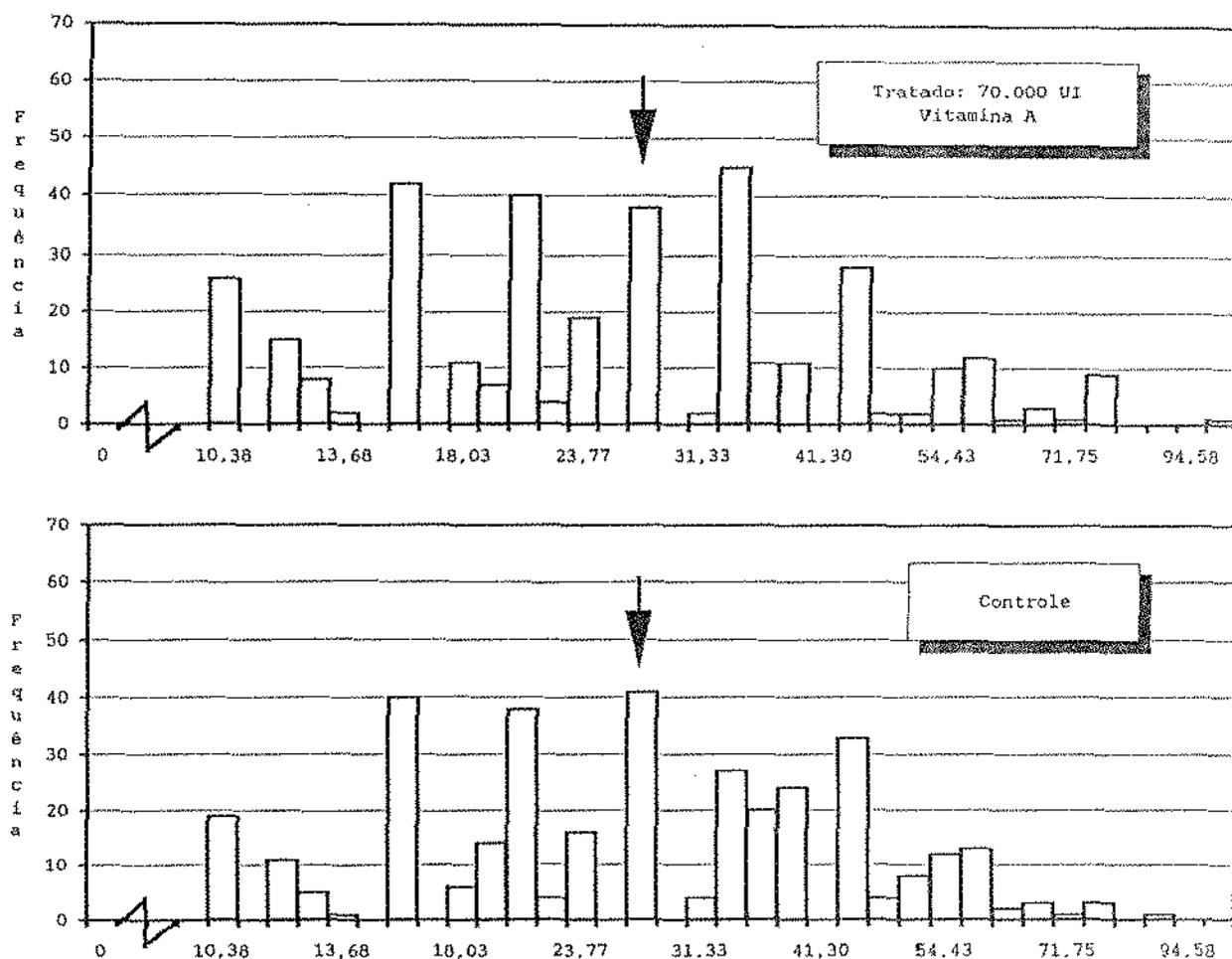
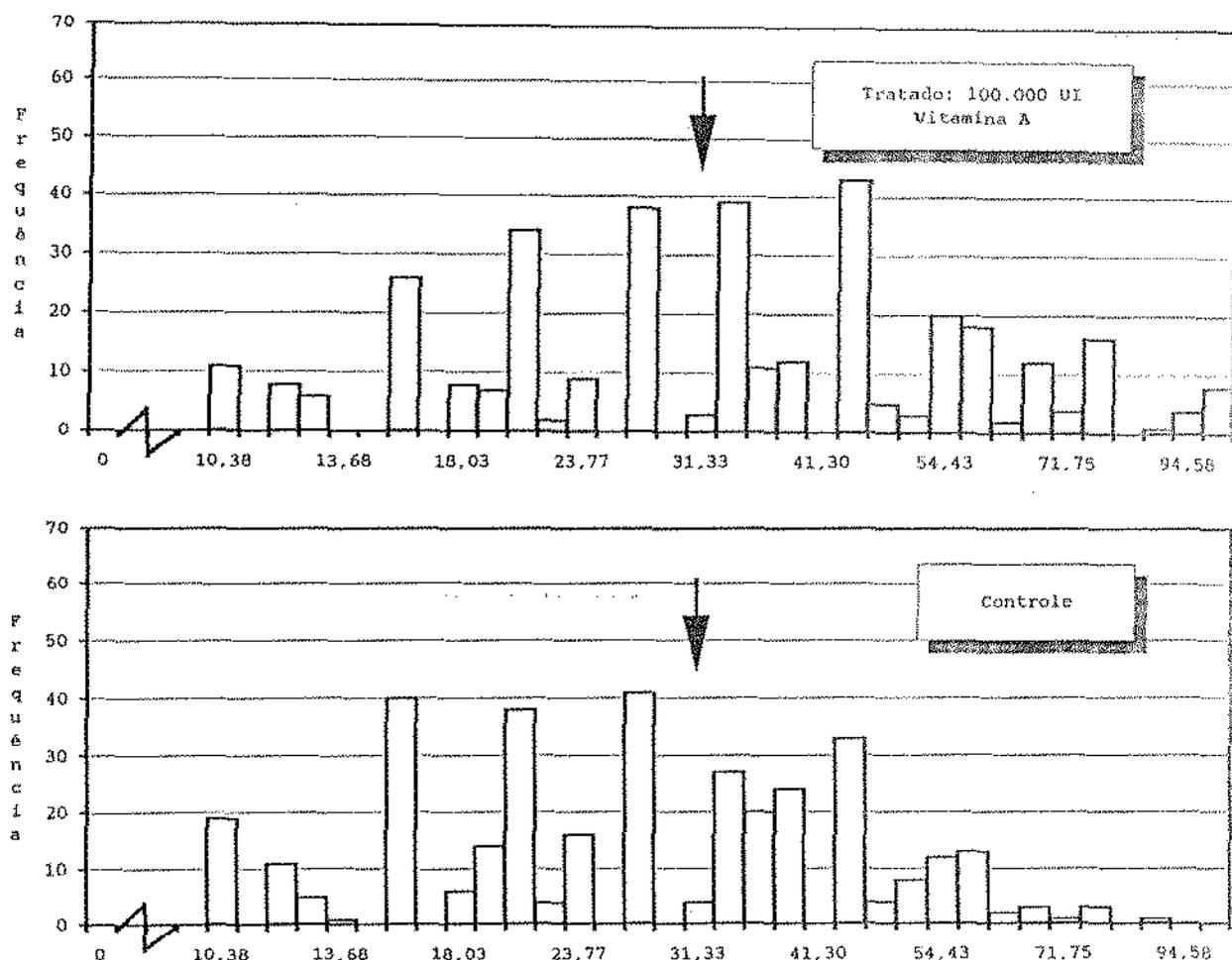


Figura 5 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 14 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	70.000 UI	Total
Menores que a mediana	154	174	328
Maiores ou iguais a mediana	196	176	372
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 2,52999607$			

### Rim de feto de rato - Túbulo Proximal



**Figura 6** - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

**Tabela 15** - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	195	149	344
Maiores ou iguais a mediana	155	201	356
Total	350	350	700
Mediana = 31,33			
$\chi^2 = 11,5748302 *$			

## Rim de feto de rato – Túbulo Proximal

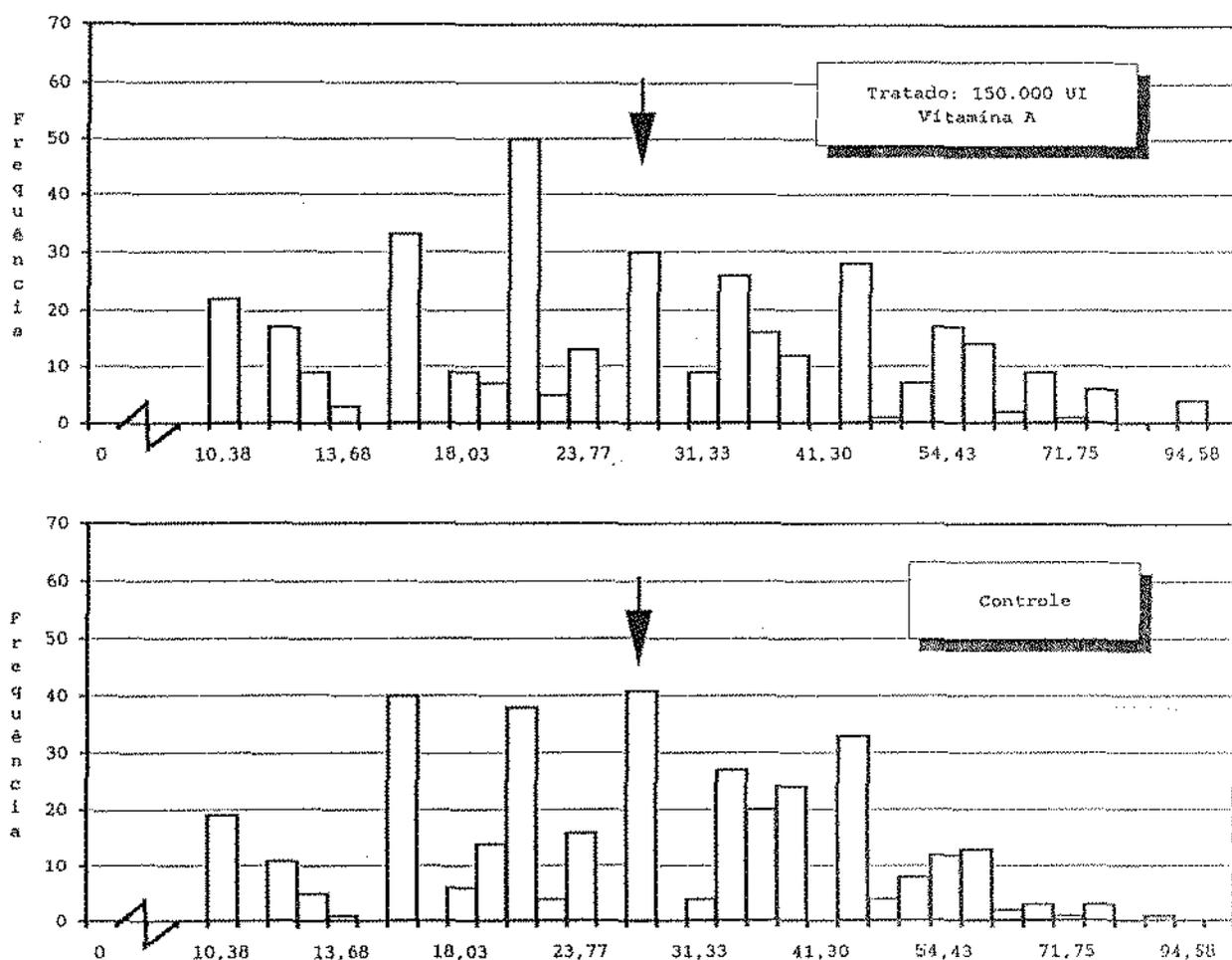
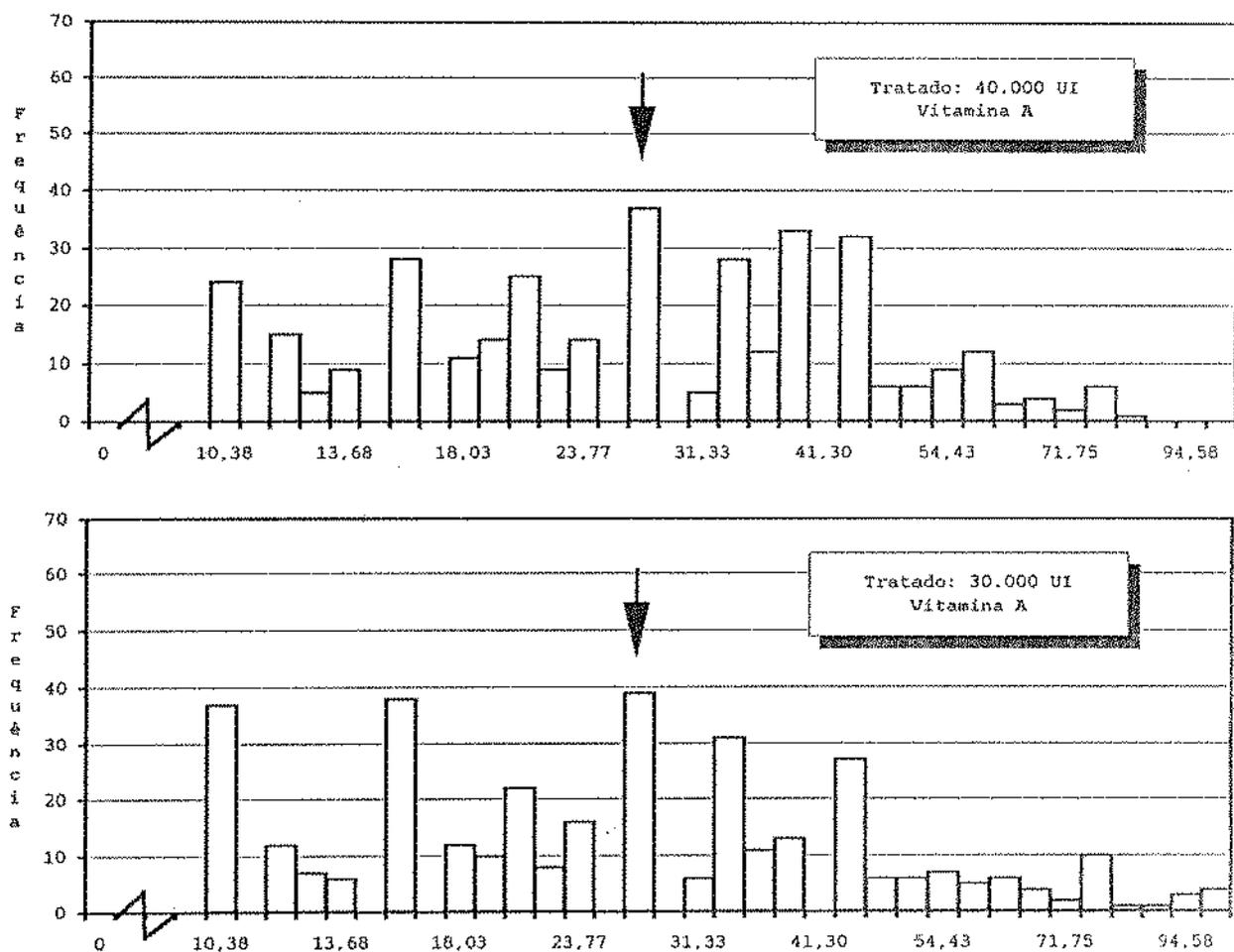


Figura 7 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 16 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	154	168	322
Maiores ou iguais a mediana	196	182	378
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 1,29399586$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Proximal

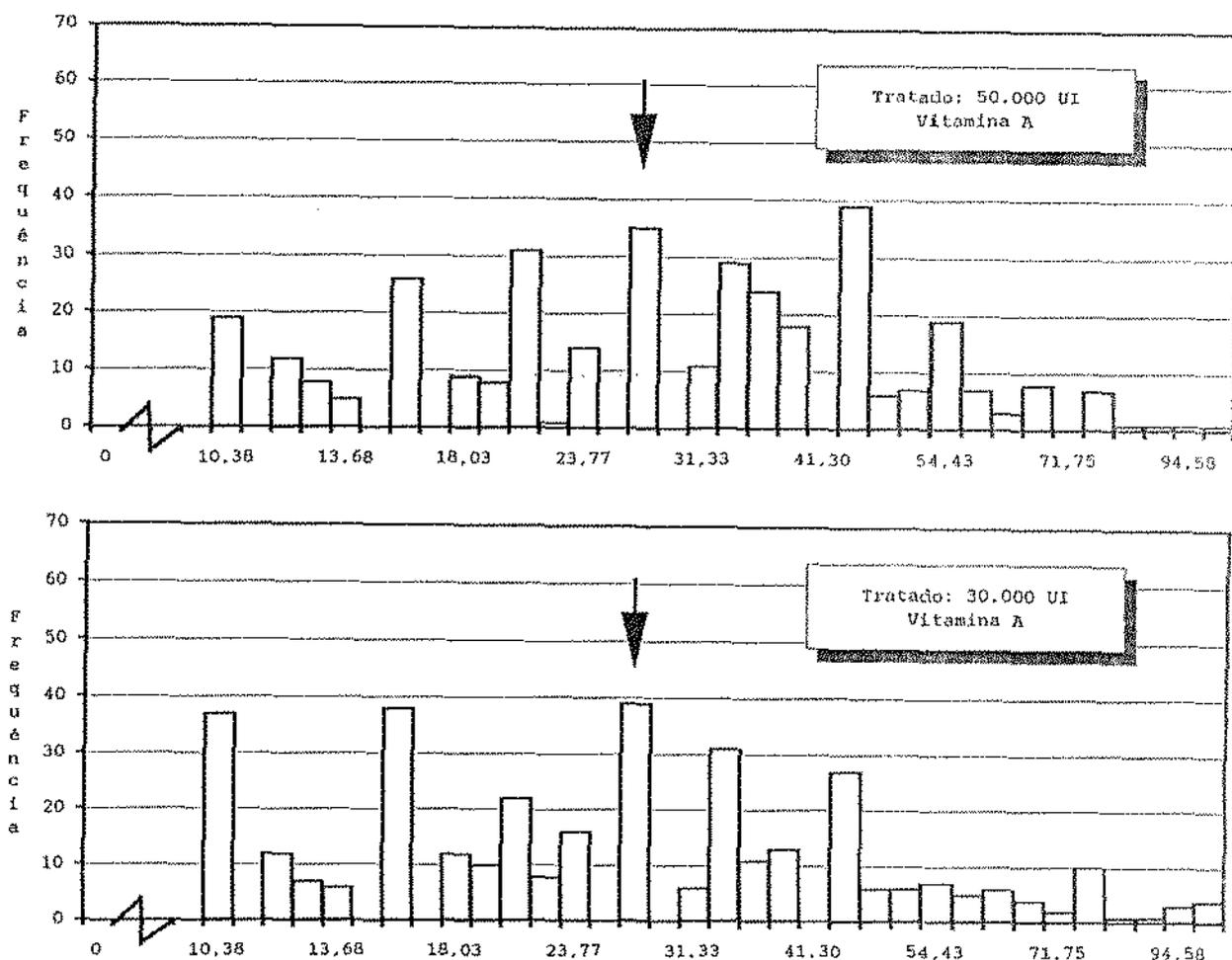


**Figura 8** – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

**Tabela 17** – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	40.000 UI	Total
Menores que a mediana	168	154	322
Maiores ou iguais a mediana	182	196	378
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 0,97193467$			

### Rim de feto de rato - Túbulo Proximal



**Figura 9** – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

**Tabela 18** – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	50.000 UI	Total
Menores que a mediana	168	133	301
Maiores ou iguais a mediana	182	217	399
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 6,73777467 *$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Proximal

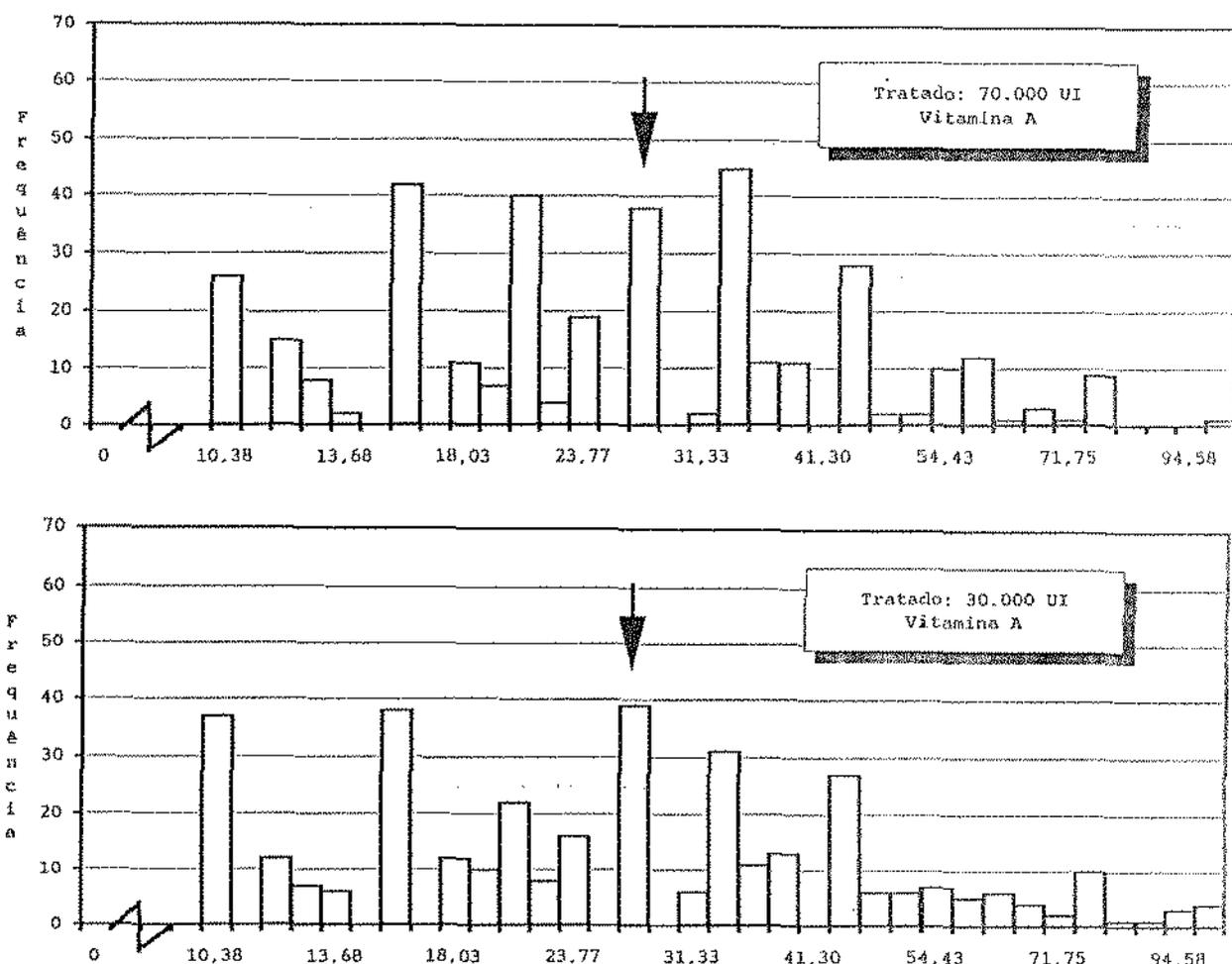
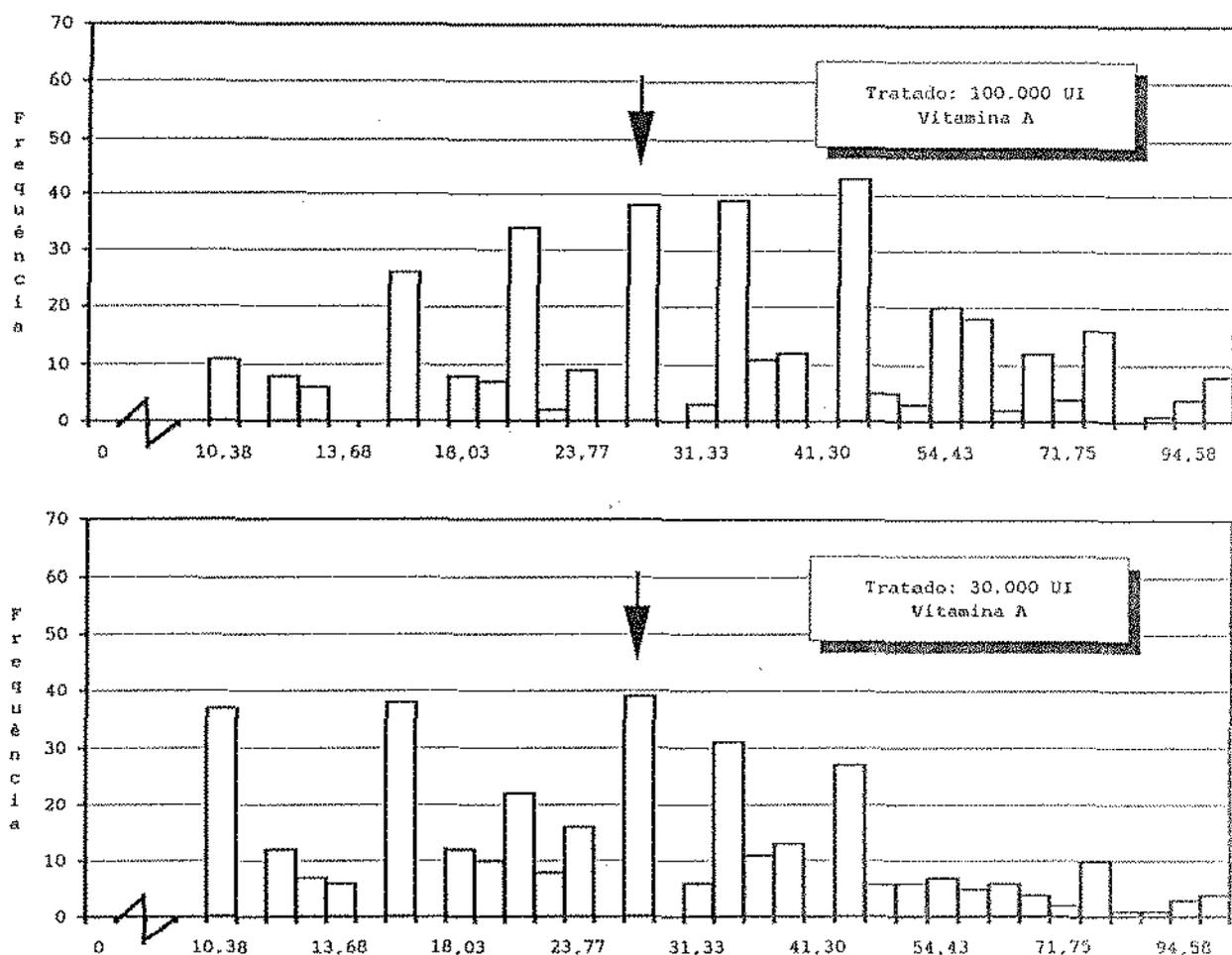


Figura 10 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 19 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	70.000 UI	Total
Menores que a mediana	168	174	342
Maiores ou iguais a mediana	182	176	358
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 0,28014636$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Proximal



**Figura 11** – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

**Tabela 20** – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	168	111	279
Maiores ou iguais a mediana	182	239	421
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 18,6890745 *$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Proximal

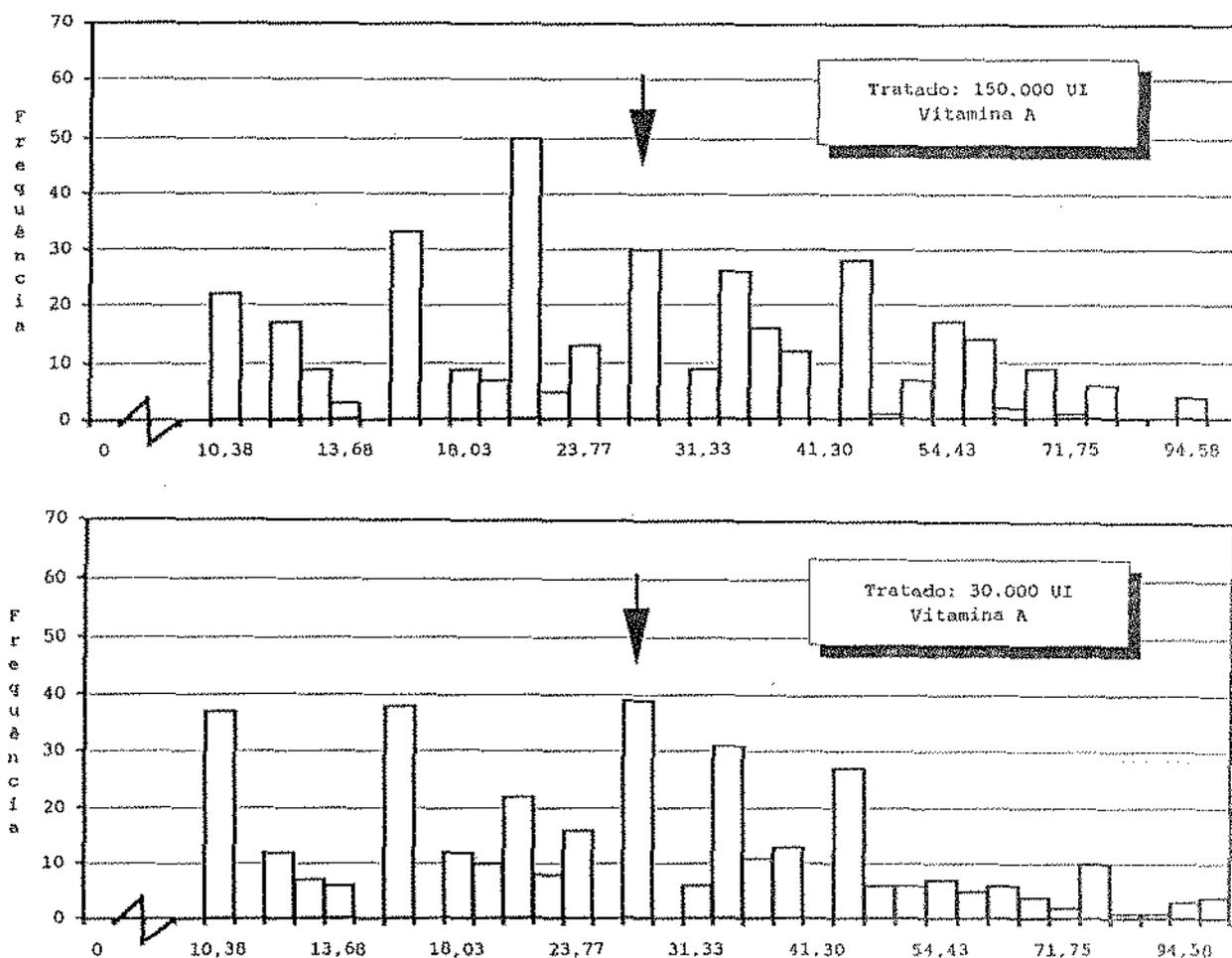


Figura 12 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 21 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	168	168	336
Maiores ou iguais a mediana	182	182	364
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 0,00572344$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Proximal

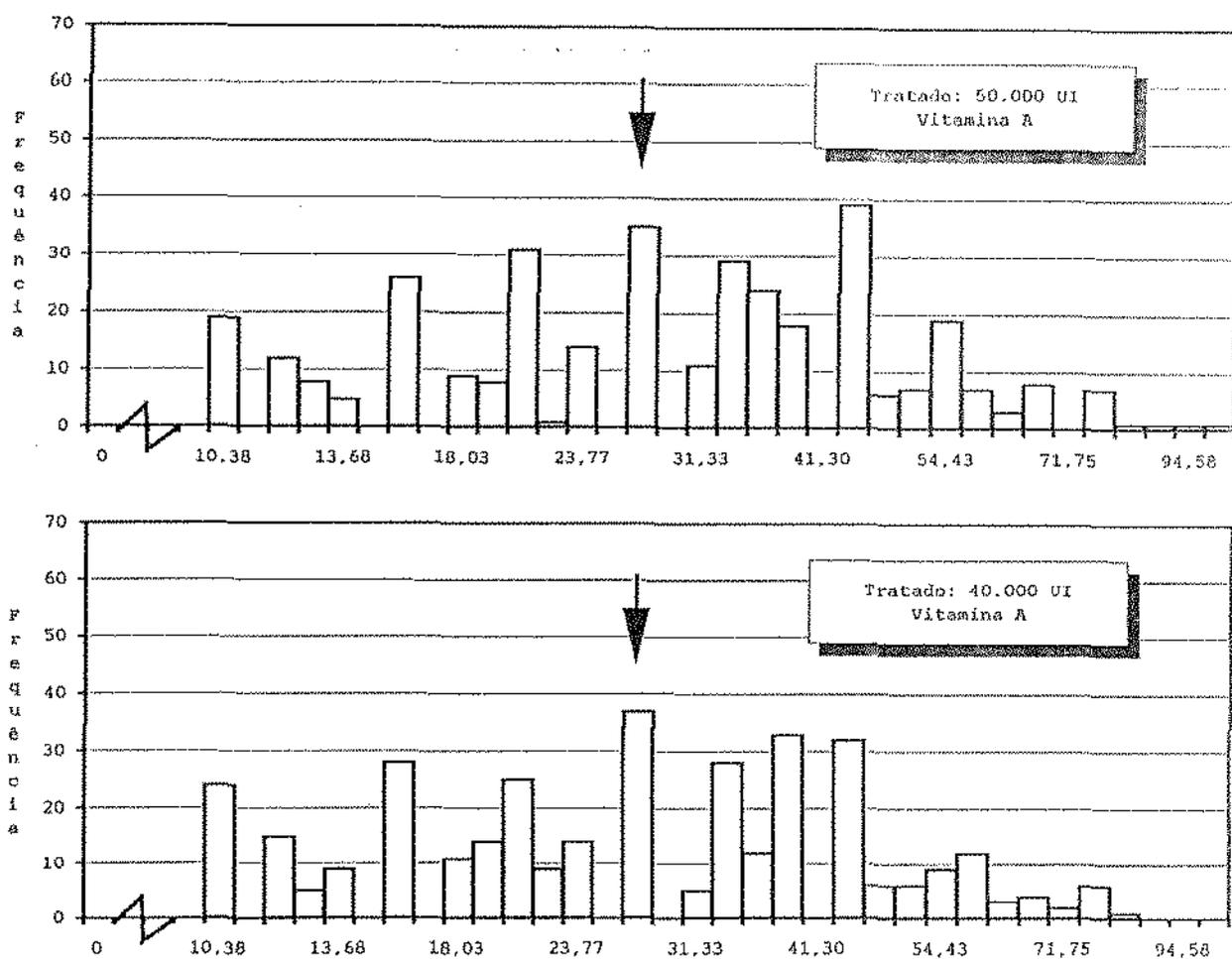
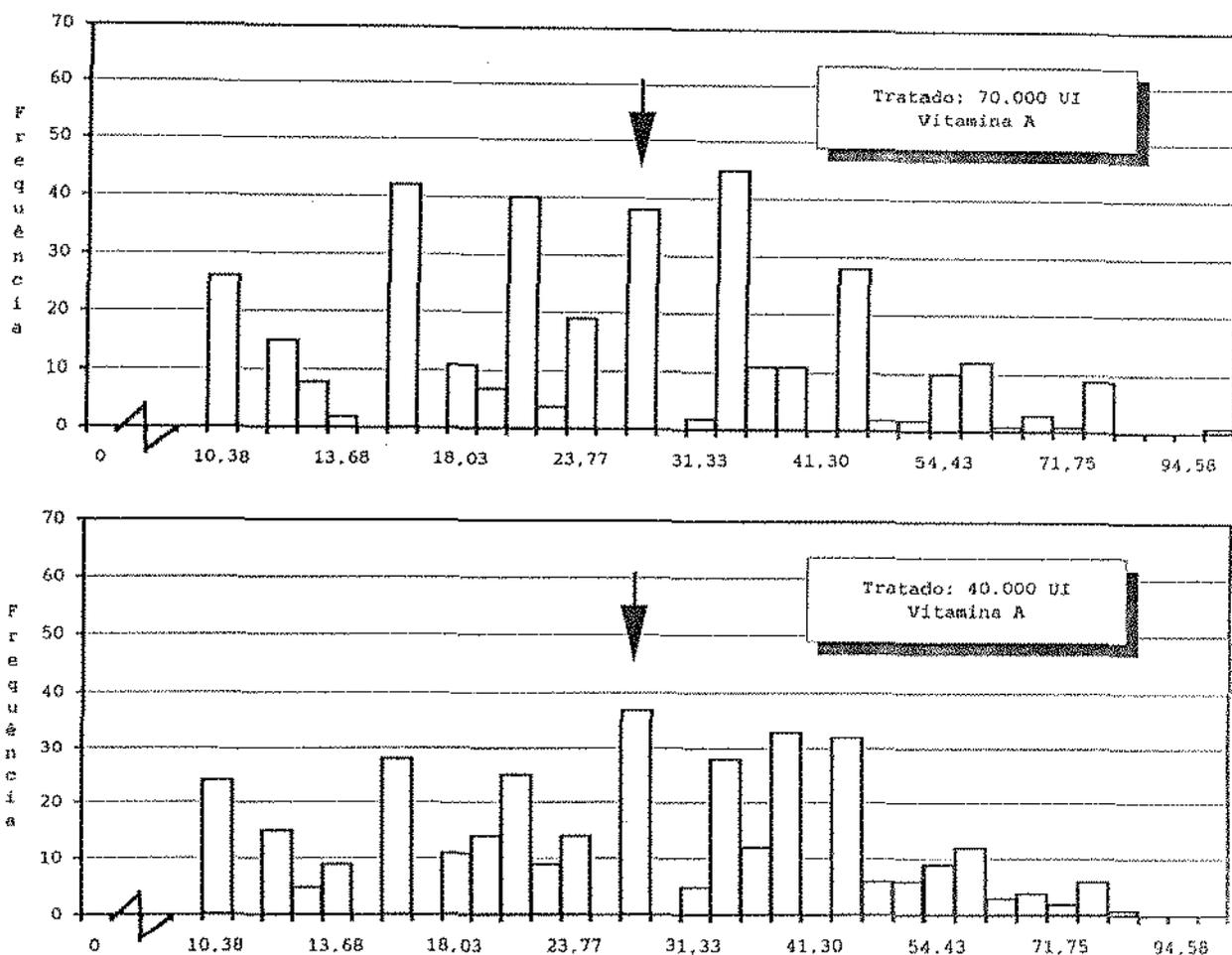


Figura 13 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 22 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	40.000 UI	50.000 UI	Total
Menores que a mediana	154	133	287
Maiores ou iguais a mediana	196	217	413
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 2,36225123$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Proximal



**Figura 14** – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

**Tabela 23** – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	40.000 UI	70.000 UI	Total
Menores que a mediana	154	174	328
Maiores ou iguais a mediana	196	176	372
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 2,52999607$			

### Rim de feto de rato - Túbulo Proximal

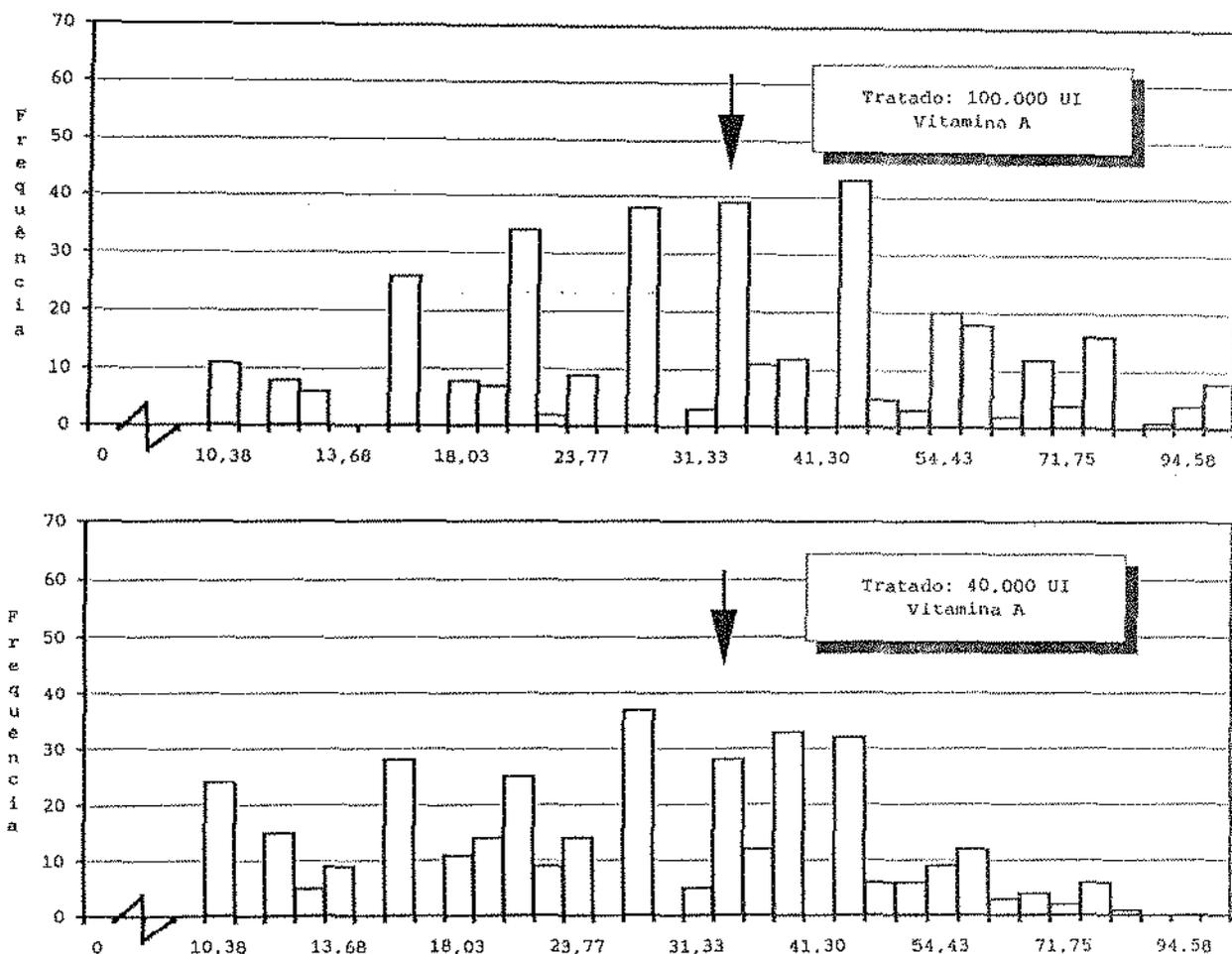
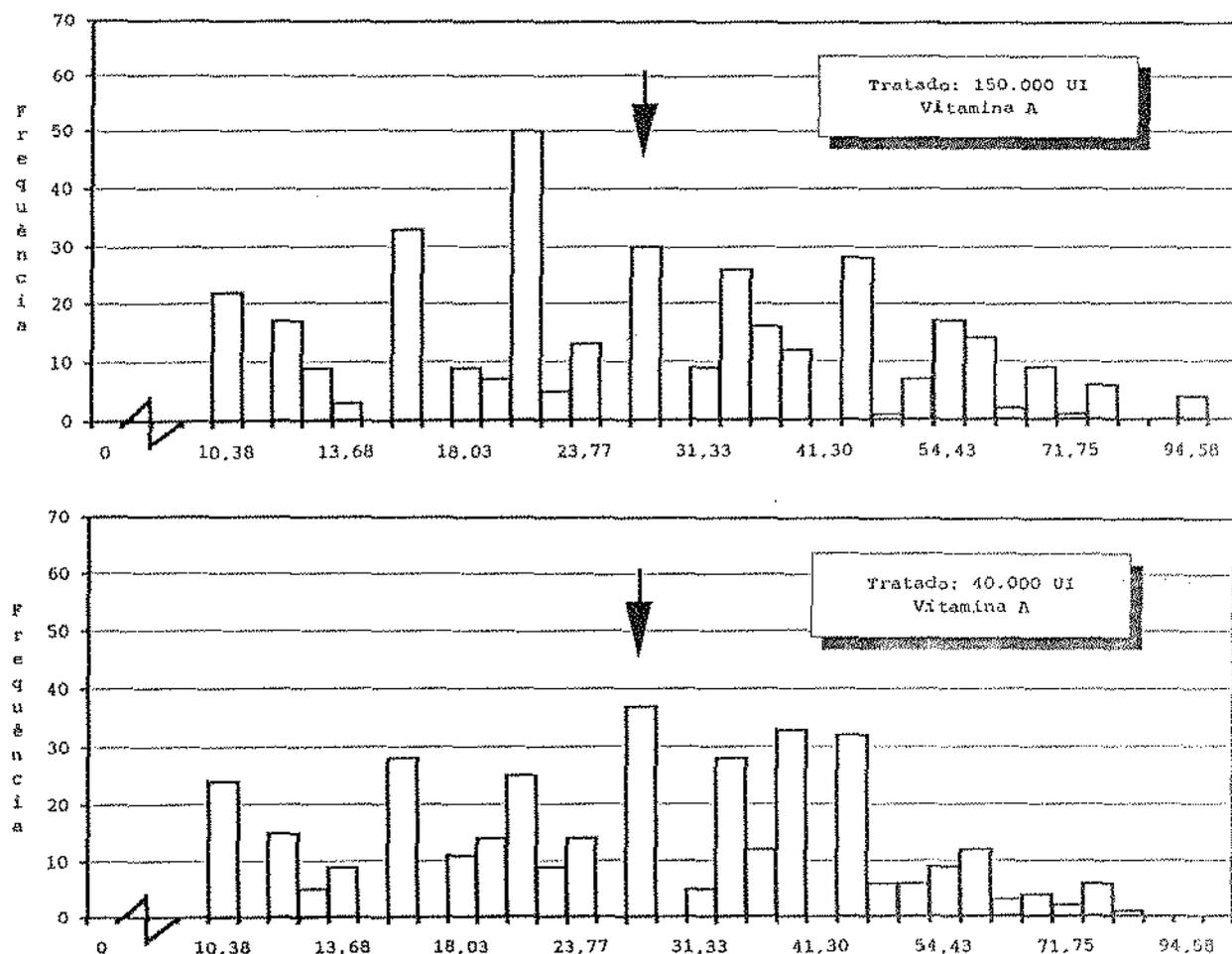


Figura 15 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 24 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	40.000 UI	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	196	152	348
Maiores ou iguais a mediana	154	198	352
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 10,5660593 *$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Proximal



**Figura 16** – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

**Tabela 25** – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	40.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	154	168	322
Maiores ou iguais a mediana	196	182	378
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 1,29399586$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Proximal

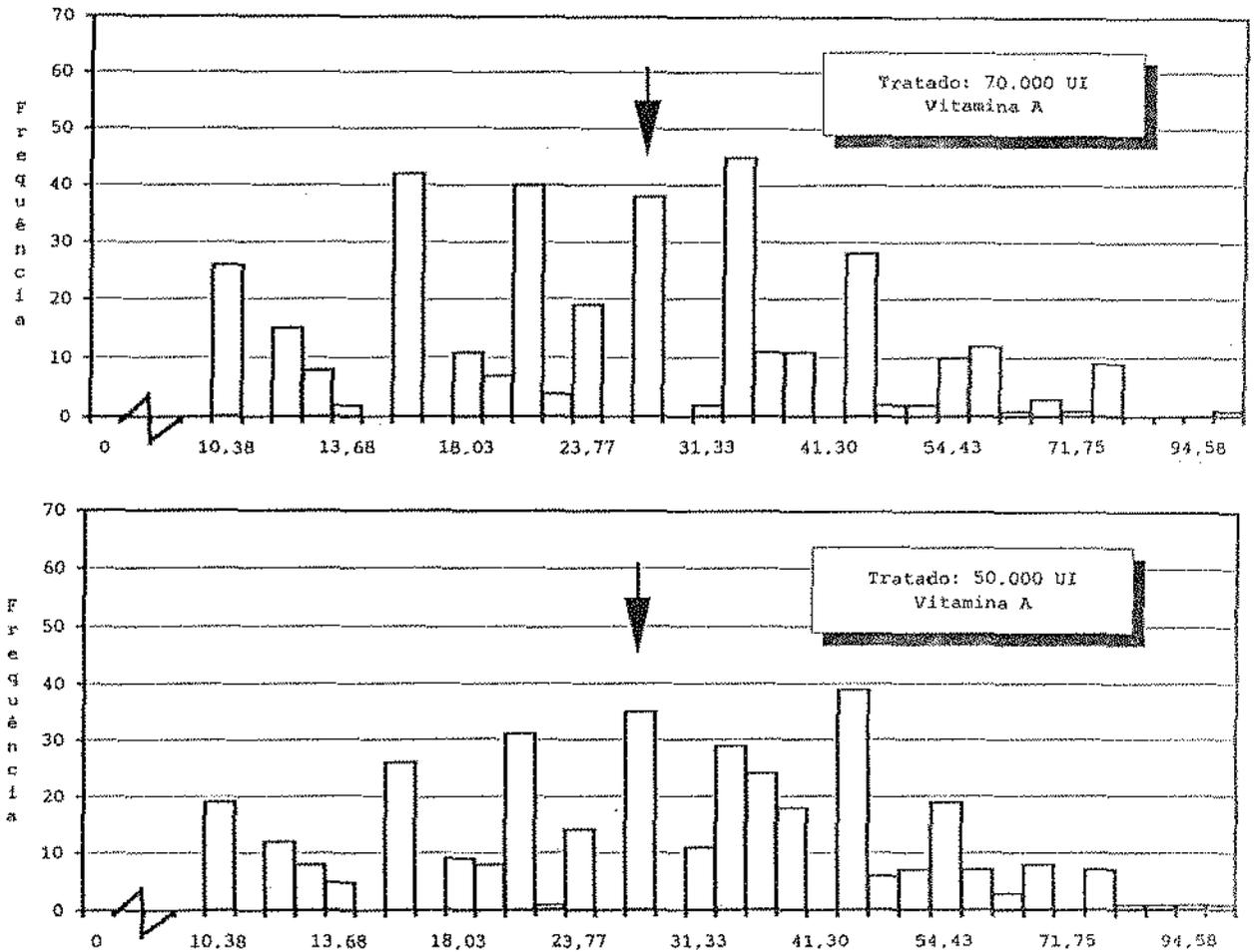


Figura 17 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 26 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	50.000 UI	70.000 UI	Total
Menores que a mediana	133	174	307
Maiores ou iguais a mediana	217	176	393
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 10,234478 *$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Proximal

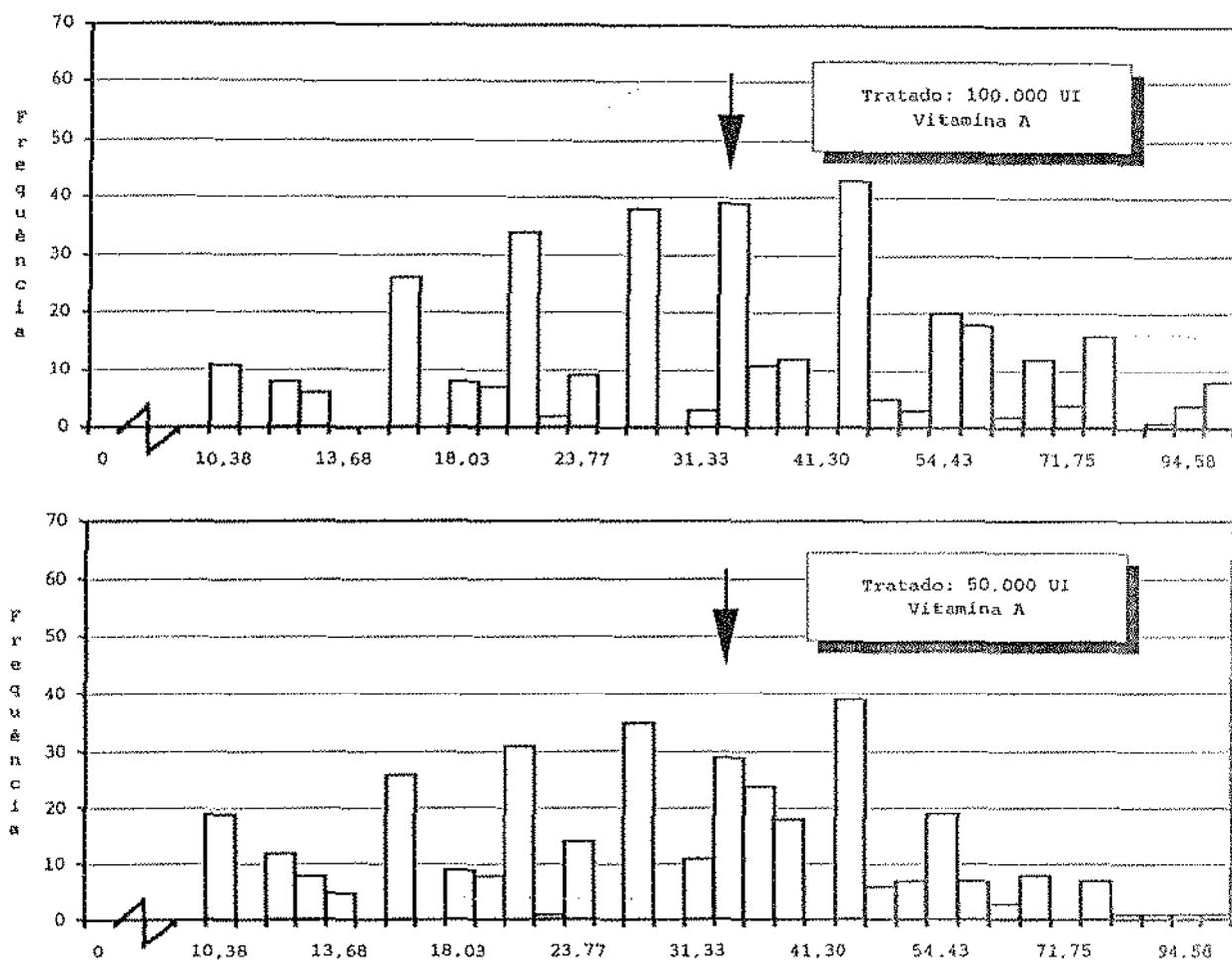


Figura 18 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 27 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	50.000 UI	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	179	152	331
Maiores ou iguais a mediana	171	198	369
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 3,87427439 *$			

### Rim de feto de rato - Túbulo Proximal

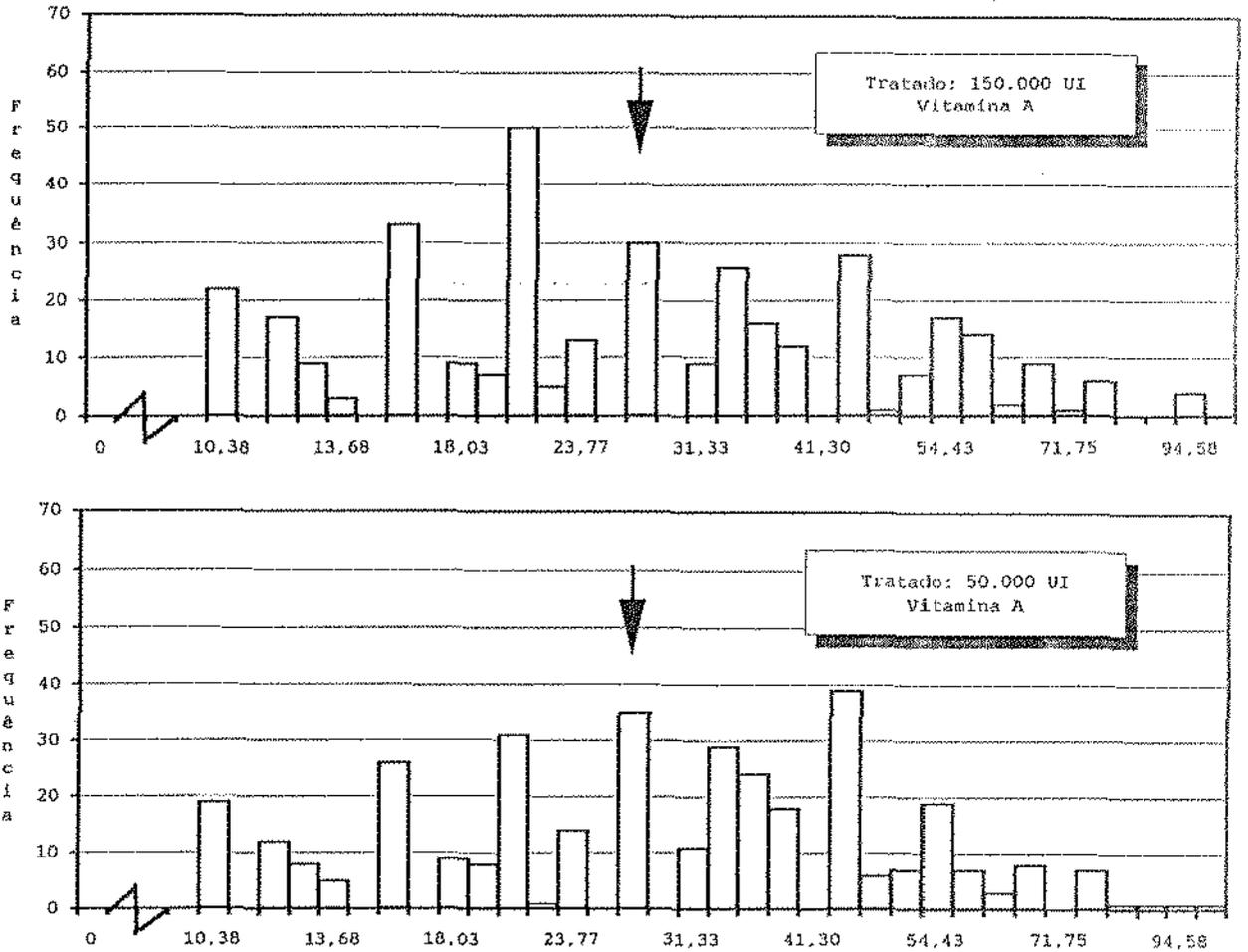


Figura 19 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 28 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	50.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	133	168	301
Maiores ou iguais a mediana	217	182	399
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 7,55376814 *$			

## Rim de feto de rato – Túbulo Proximal

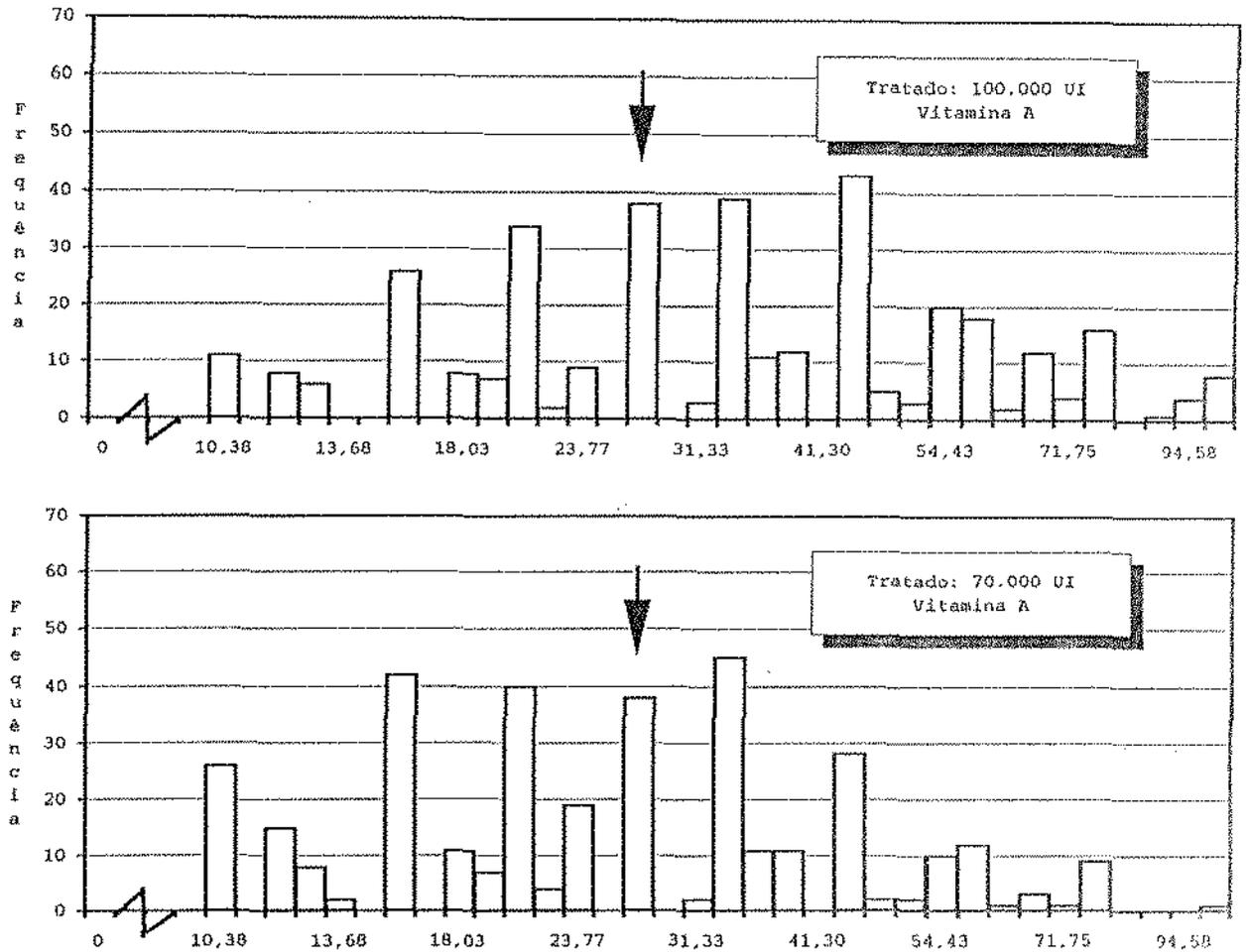


Figura 20 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 29 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	70.000 UI	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	174	111	285
Maiores ou iguais a mediana	176	239	415
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 22,75033699 *$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Proximal

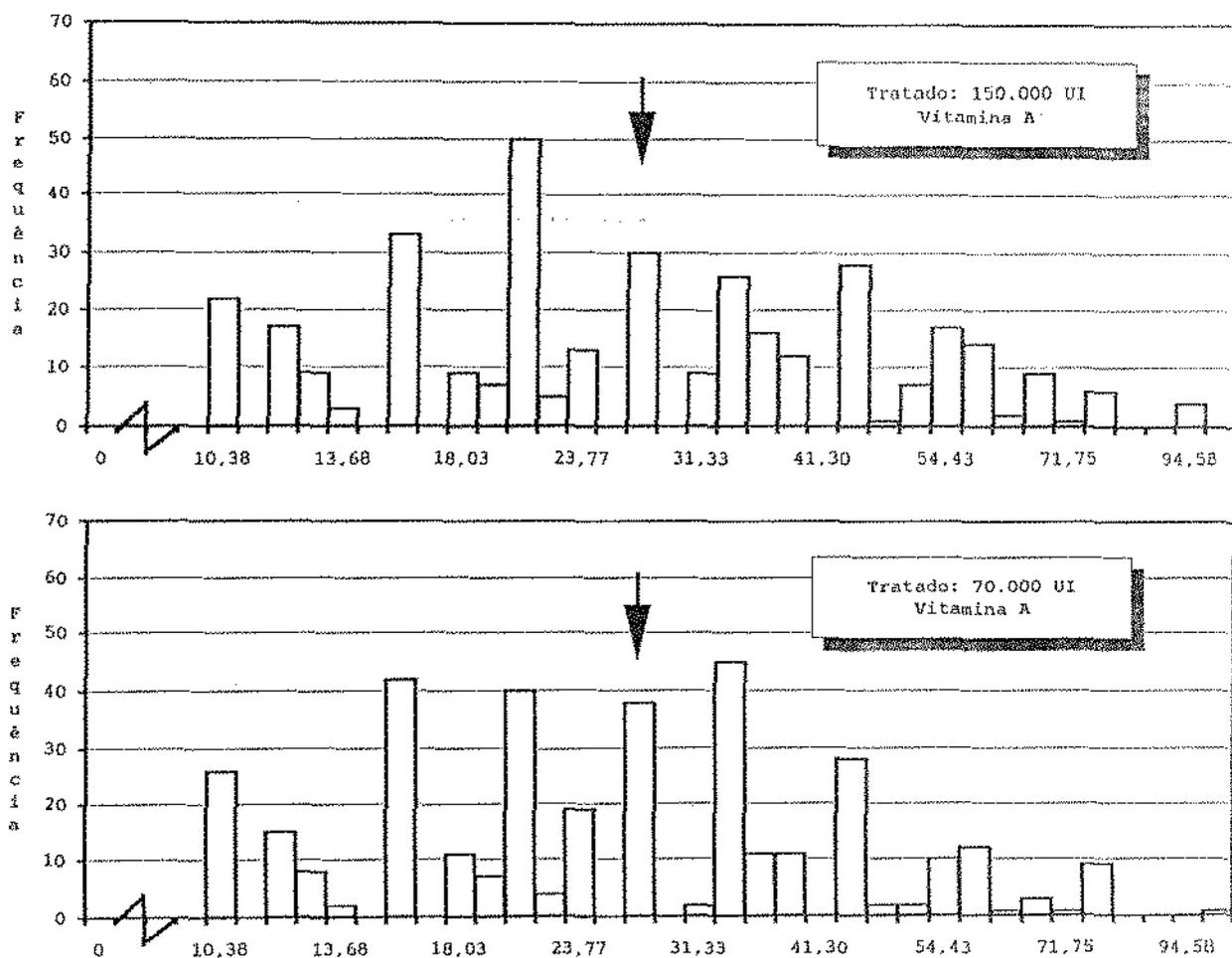


Figura 21 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 30 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	70.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	174	168	342
Maiores ou iguais a mediana	176	182	358
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 0,14293182$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Proximal

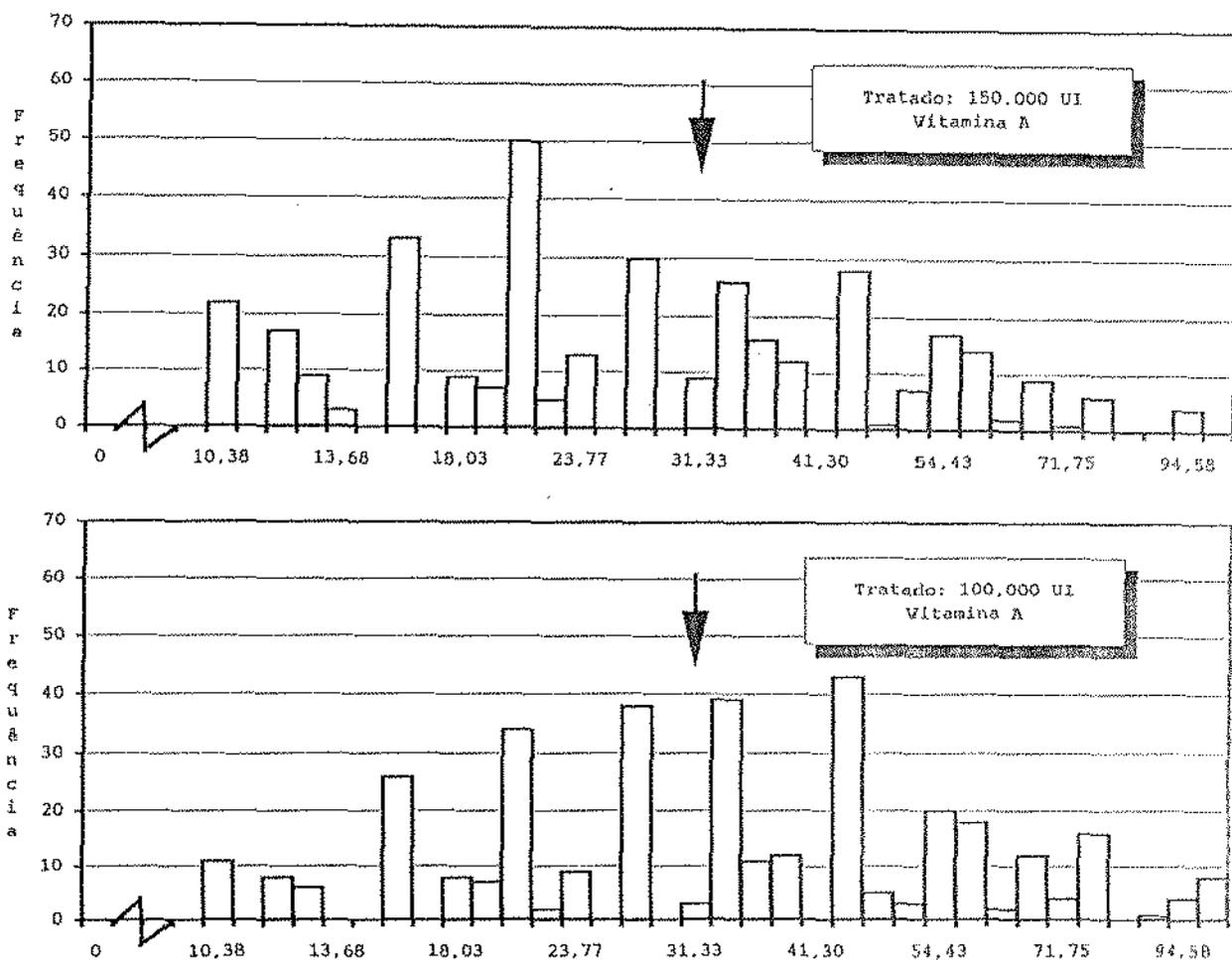


Figura 22 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 31 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	100.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	149	198	347
Maiores ou iguais a mediana	201	152	353
Total	350	350	700
Mediana = 31,33			
$\chi^2 = 14,2867639 *$			

### Rim de feto de rato - Túbulo Distal

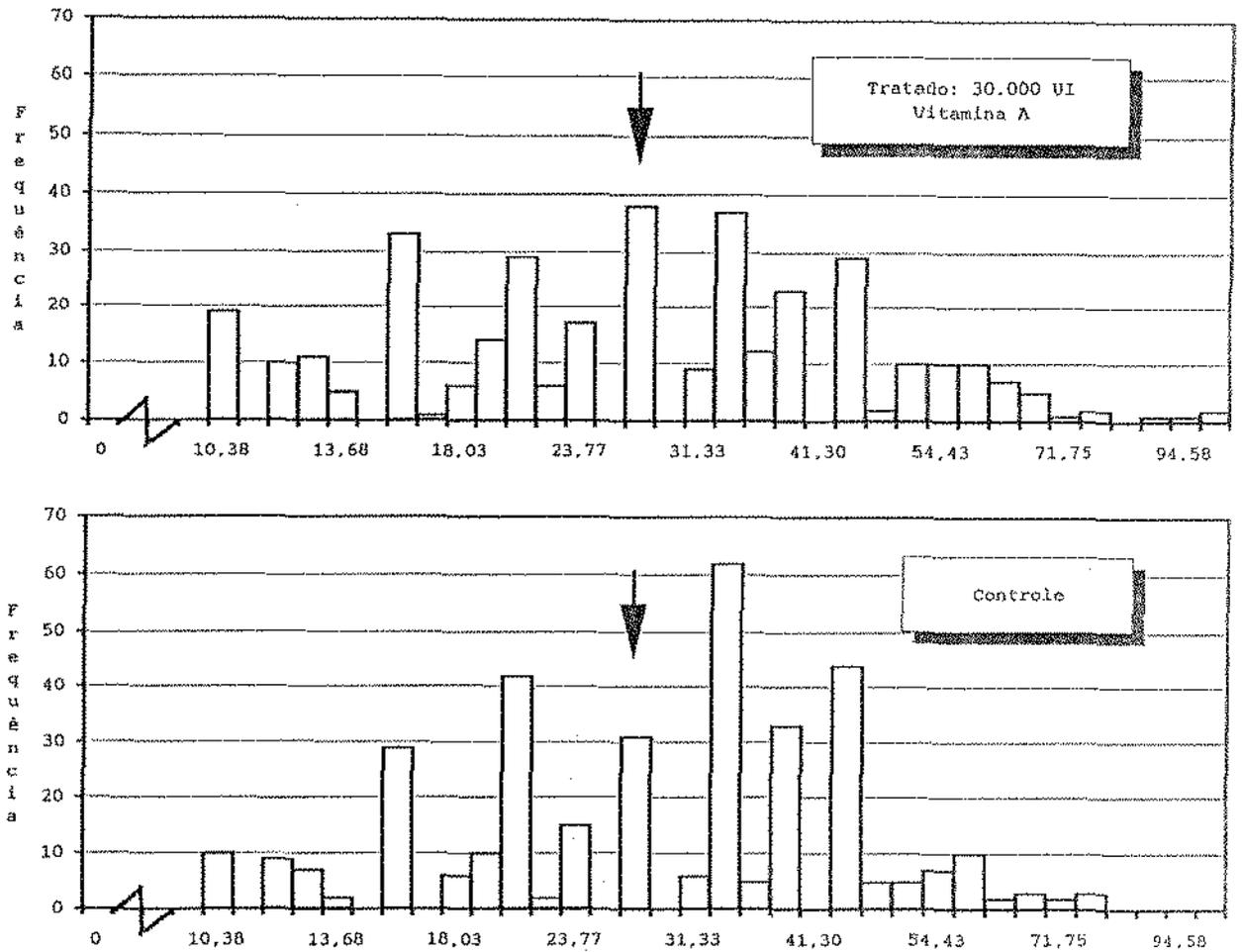


Figura 23 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 32 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	30.000 UI	Total
Menores que a mediana	132	151	283
Maiores ou iguais a mediana	218	199	417
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 2,37266018$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Distal

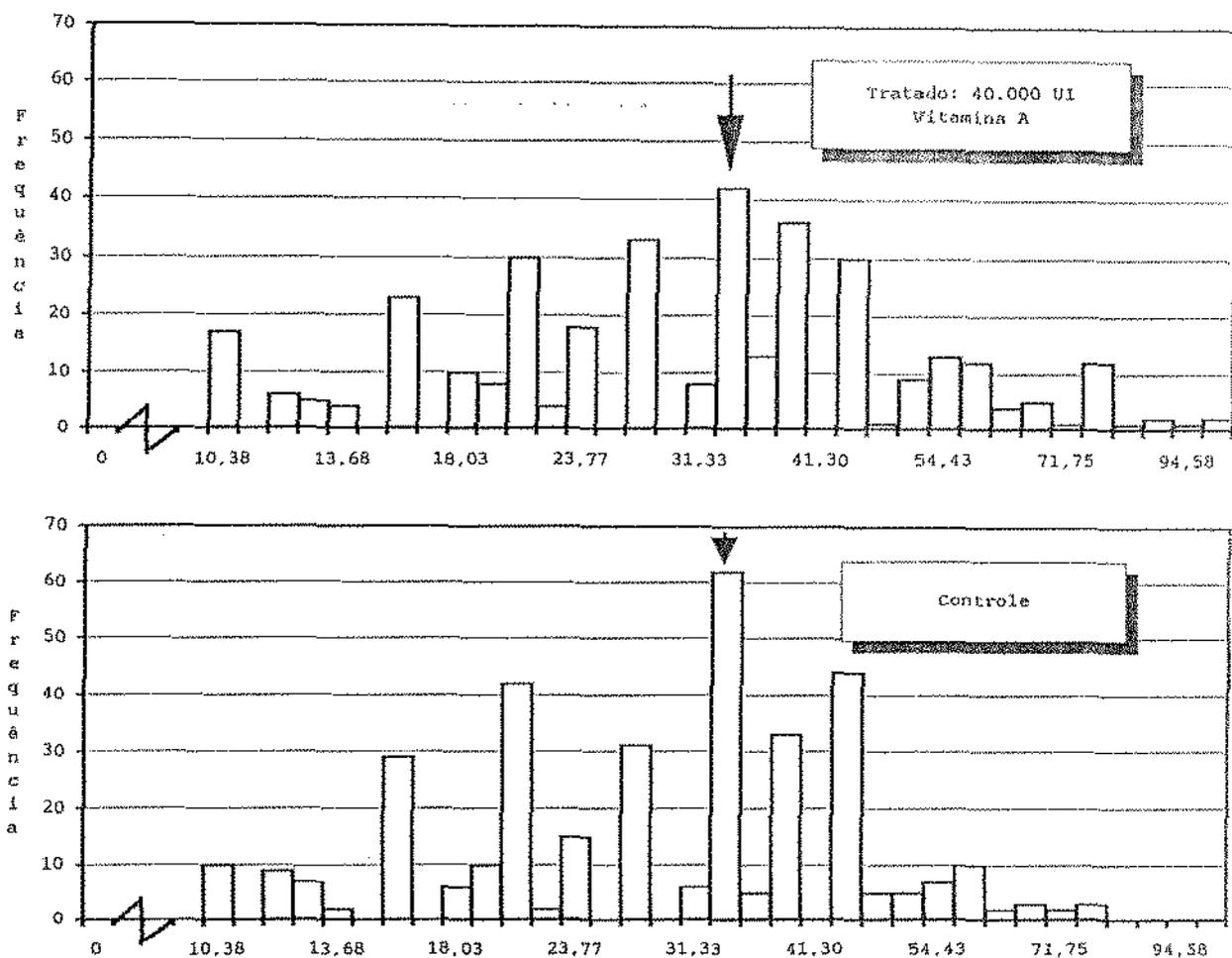


Figura 24 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 33 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	40.000 UI	Total
Menores que a mediana	169	166	335
Maiores ou iguais a mediana	181	184	365
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 0,0228992$			

### Rim de feto de rato - Túbulo Distal

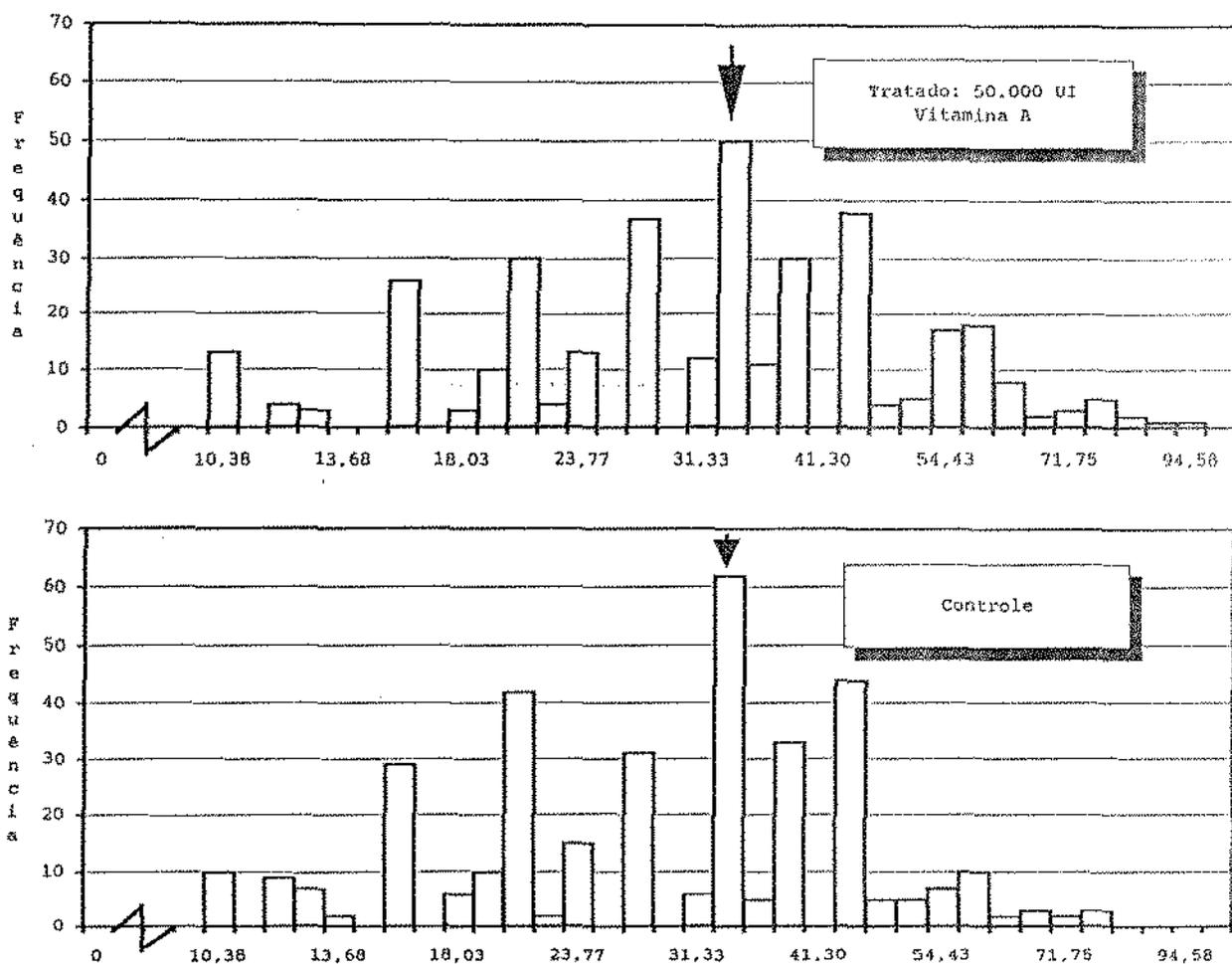


Figura 25 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 34 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	50.000 UI	Total
Menores que a mediana	169	155	324
Maiores ou iguais a mediana	181	195	376
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 0,97107302$			

## Rim de feto de rato – Túbulo Distal

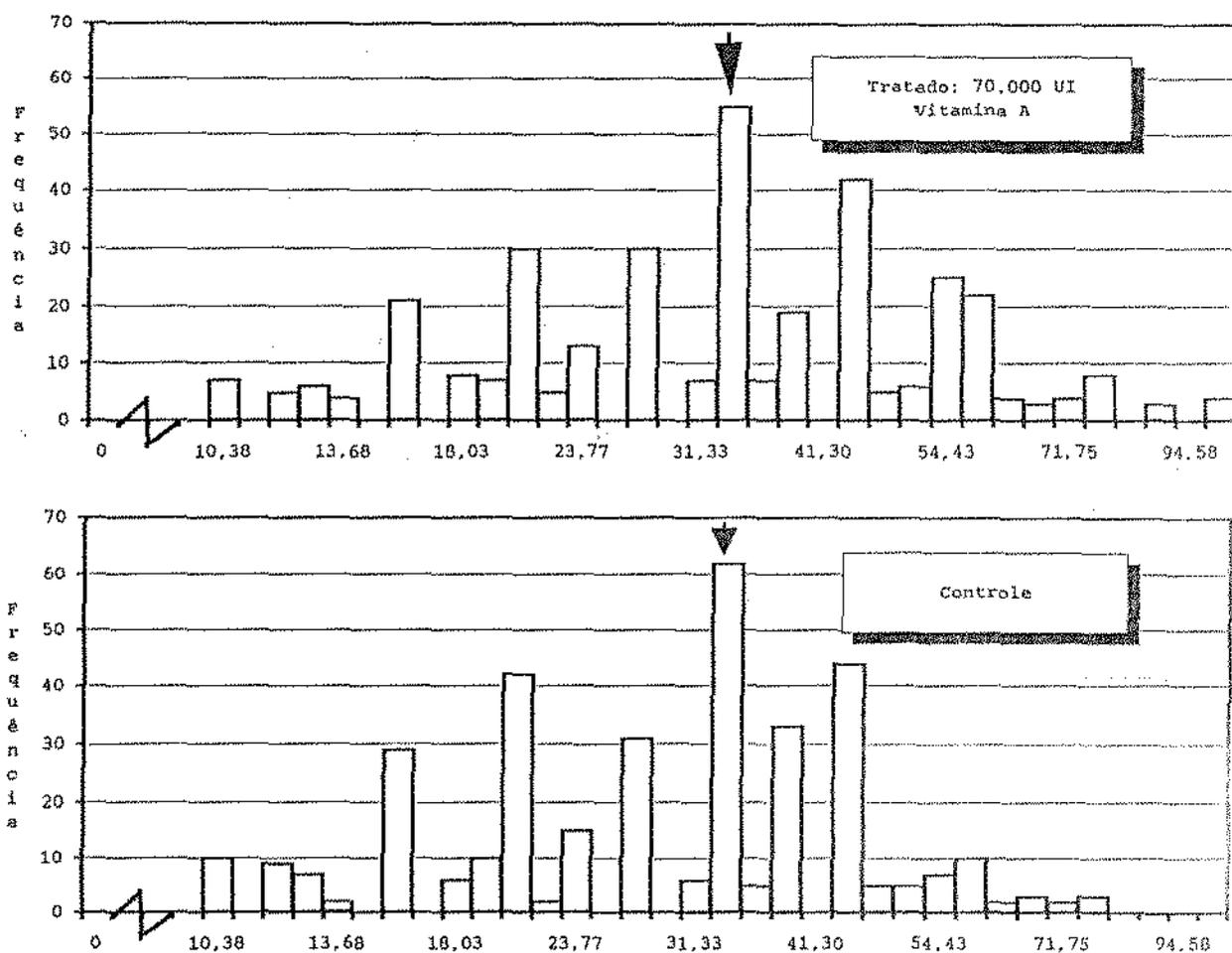


Figura 26 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 35 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	70.000 UI	Total
Menores que a mediana	169	143	312
Maiores ou iguais a mediana	181	207	388
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 3,61402987$			

### Rim de feto de rato - Túbulo Distal

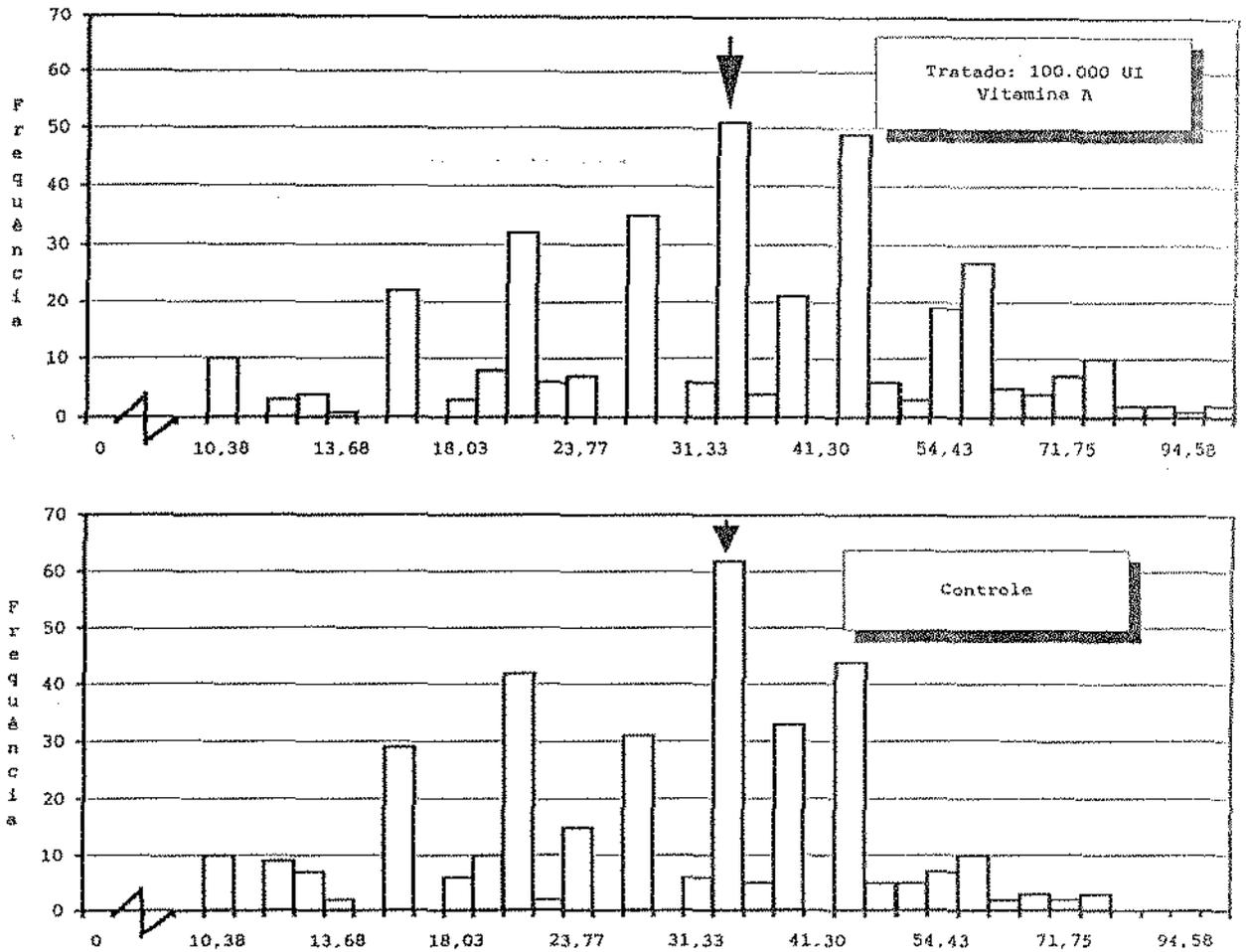


Figura 27 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumens Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 36 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	169	137	306
Maiores ou iguais a mediana	181	213	394
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 5,57960917 *$			

Rim de feto de rato – Túbulo Distal

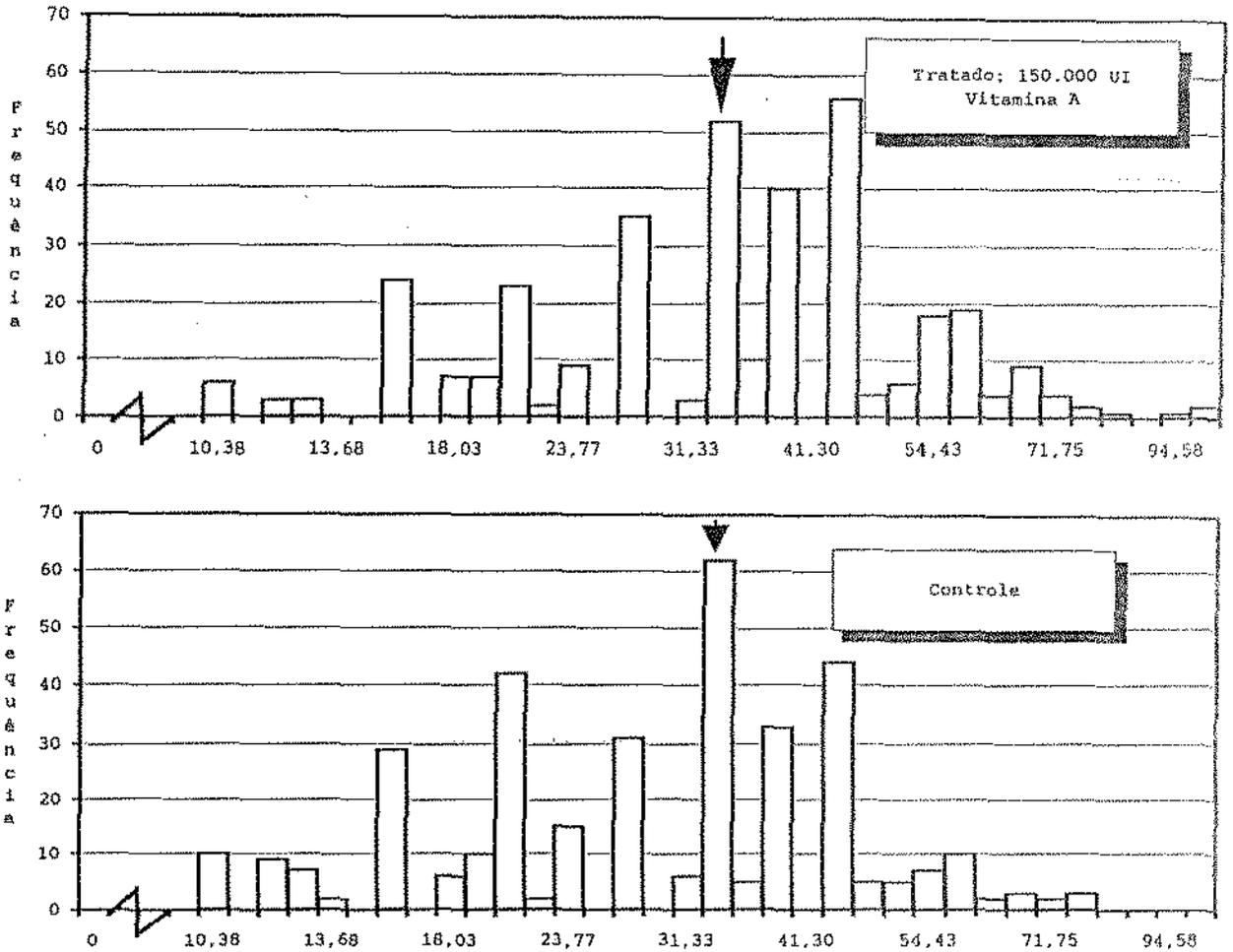


Figura 28 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 37 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	169	122	291
Maiores ou iguais a mediana	181	228	409
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 12,4450718 *$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Distal

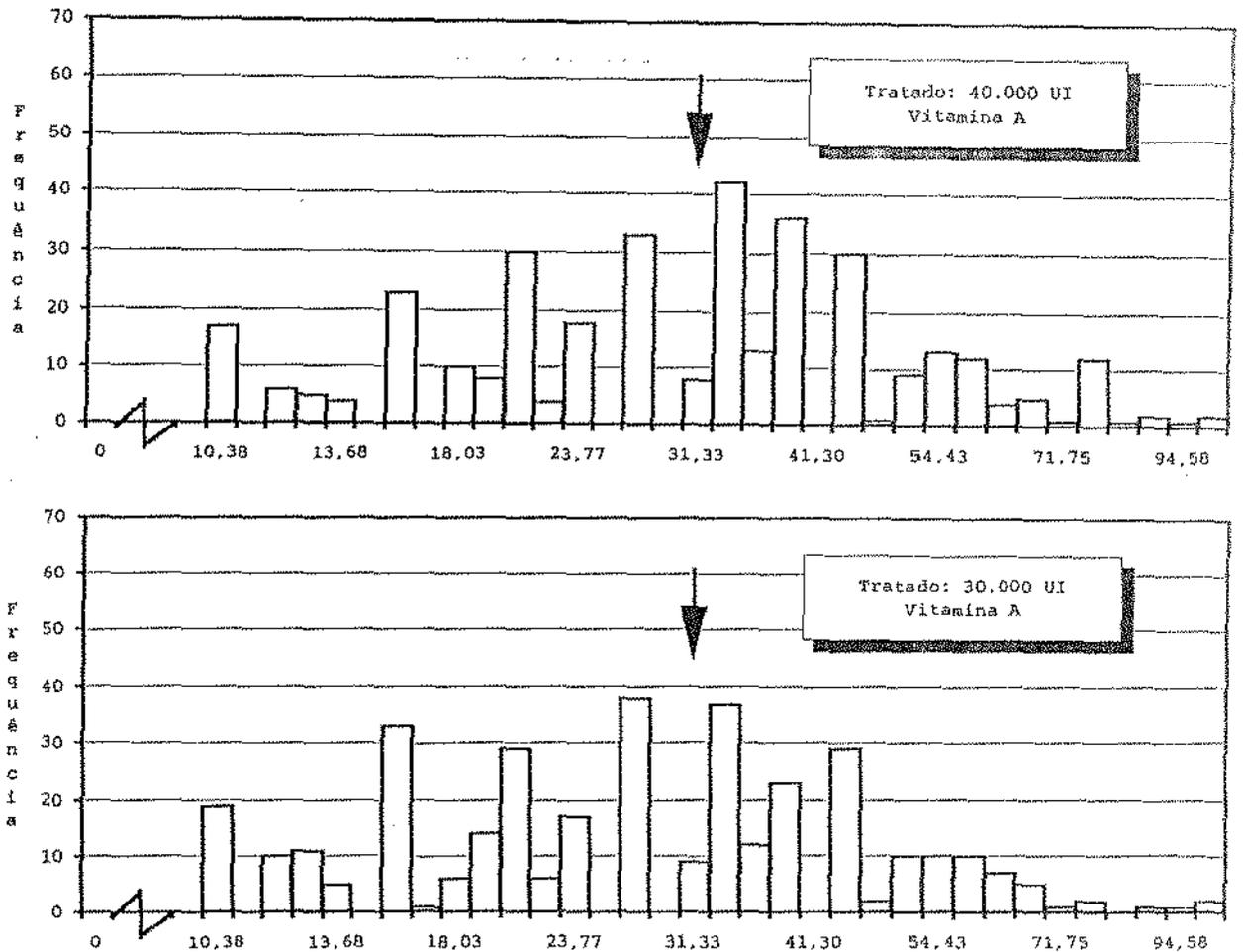


Figura 29 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 38 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	40.000 UI	Total
Menores que a mediana	189	158	347
Maiores ou iguais a mediana	161	192	353
Total	350	350	700
Mediana = 31,33			
$\chi^2 = 5,14323501 *$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Distal

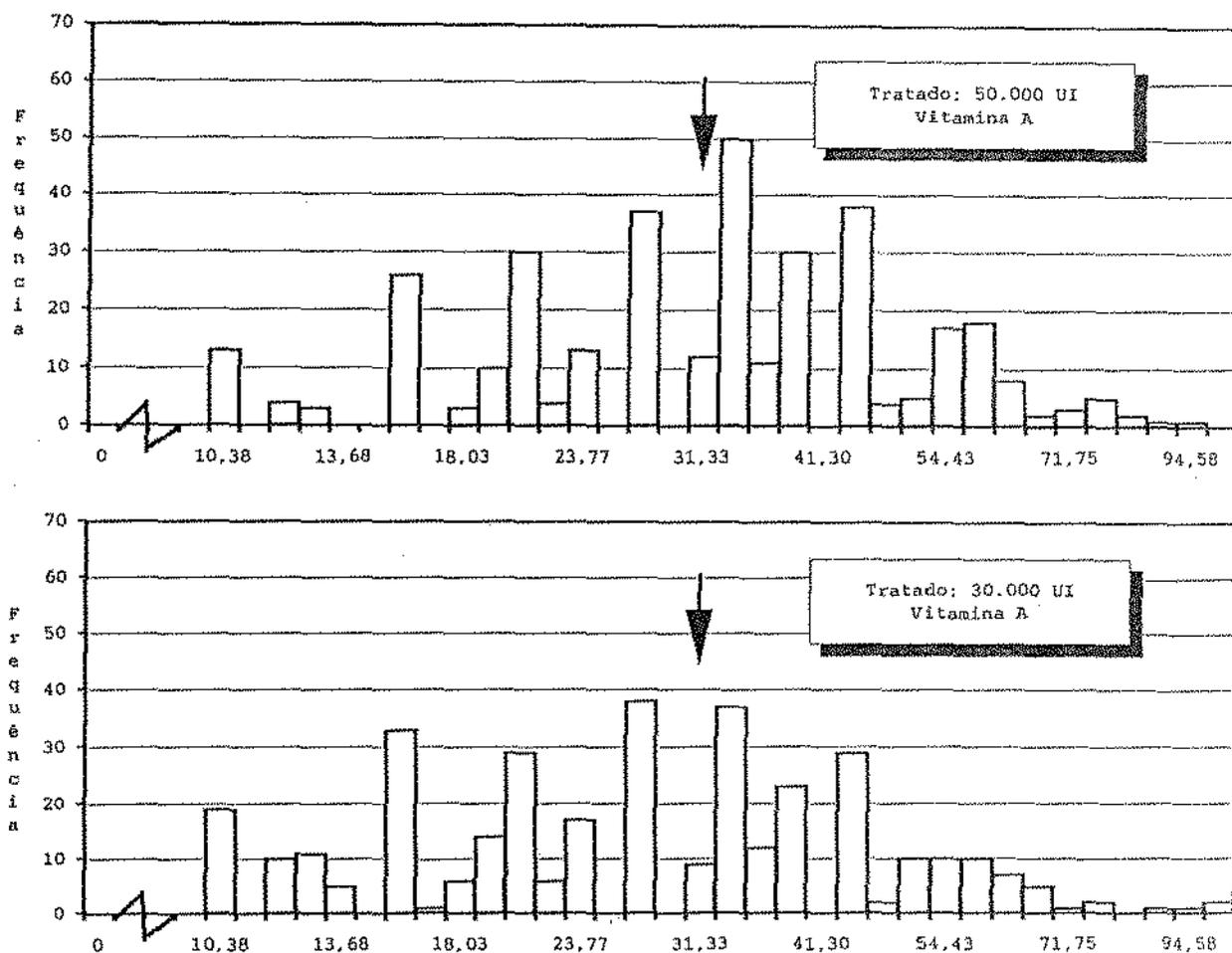


Figura 30 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 39 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	50.000 UI	Total
Menores que a mediana	189	143	332
Maiores ou iguais a mediana	161	207	368
Total	350	350	700
Mediana = 31,33			
$\chi^2 = 11,602115 *$			

Rim de feto de rato - Túbulo Distal

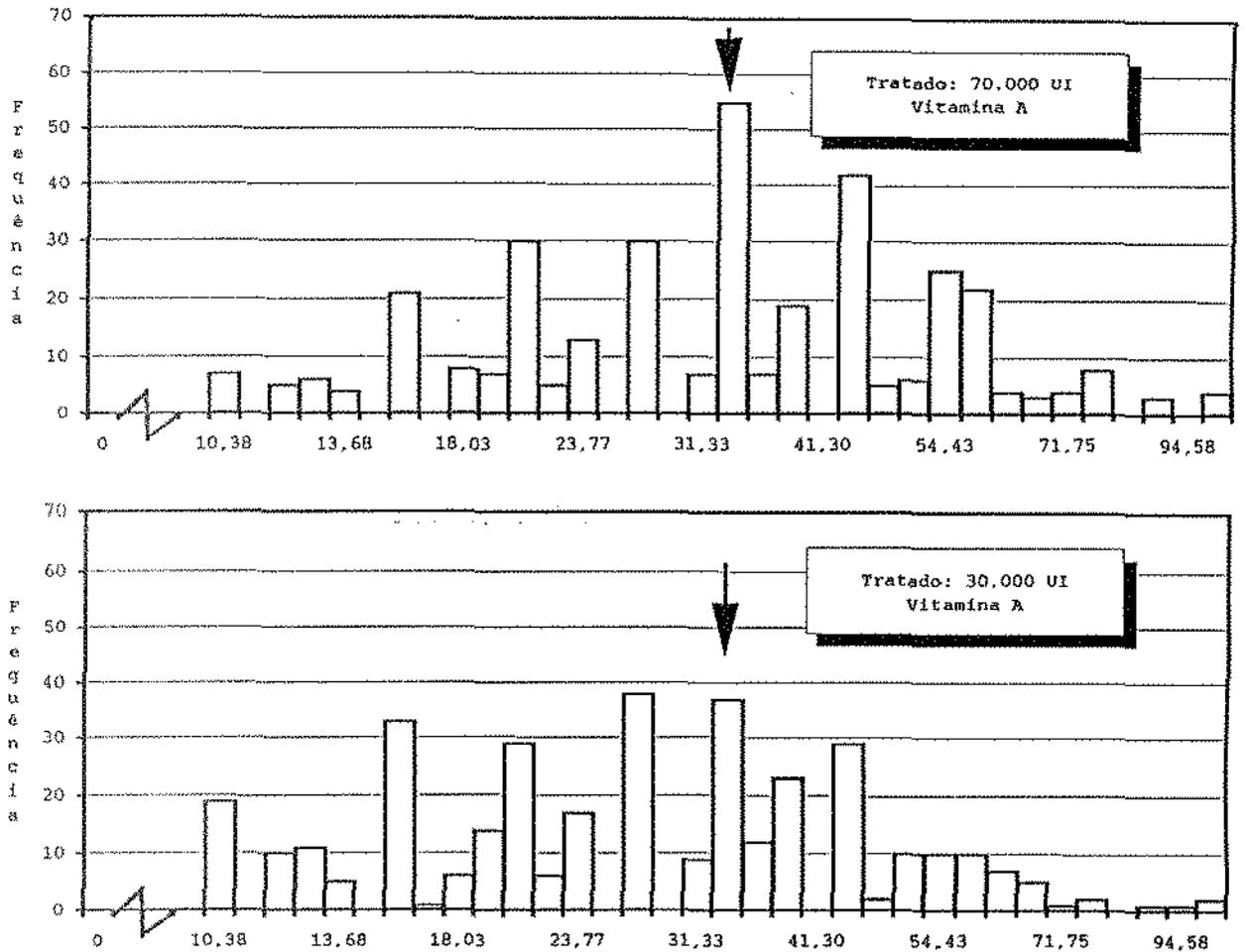


Figura 31 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 40 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	70.000 UI	Total
Menores que a mediana	198	143	341
Maiores ou iguais a mediana	152	207	359
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 16,6738823 *$			

### Rim de feto de rato - Túbulo Distal

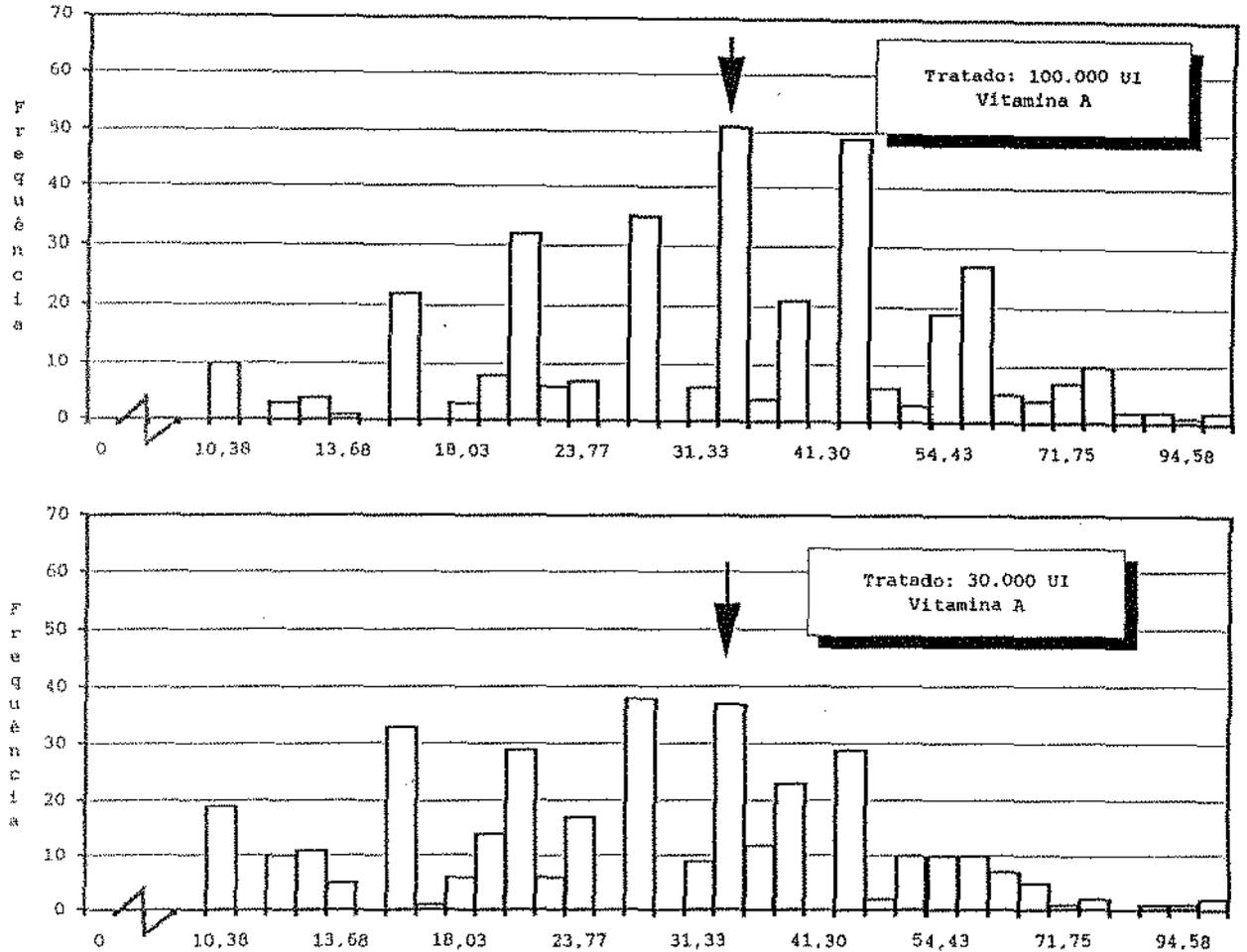


Figura 32 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 41 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	198	137	335
Maiores ou iguais a mediana	152	213	365
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 20,6092824 *$			

### Rim de feto de rato - Túbulo Distal

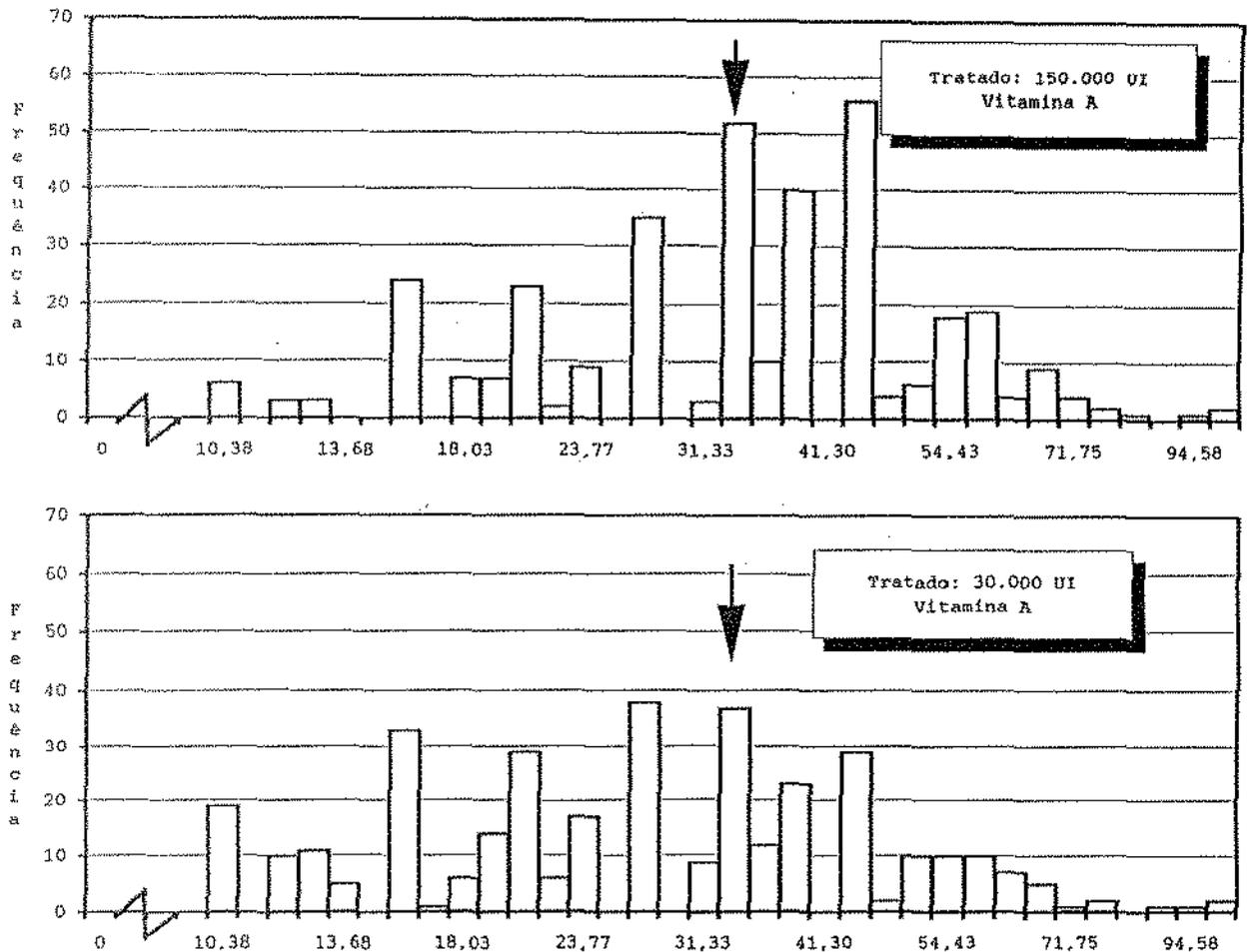


Figura 33 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 42 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	198	122	320
Maiores ou iguais a mediana	152	228	380
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 32,3807566 *$			

### Rim de feto de rato - Túbulo Distal

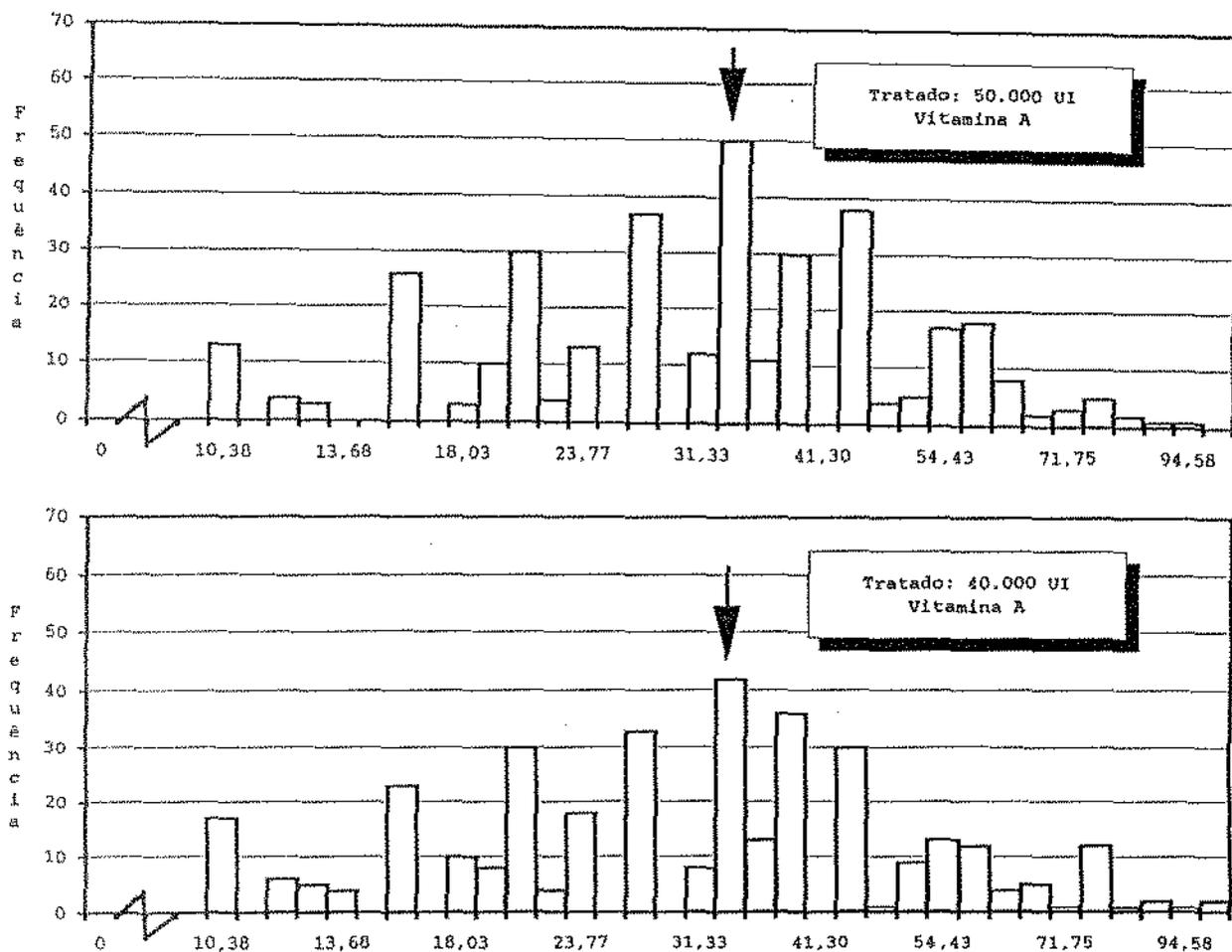


Figura 34 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 43 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	40.000 UI	50.000 UI	Total
Menores que a mediana	166	155	321
Maiores ou iguais a mediana	184	195	379
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 0,57537872$			

## Rim de feto de rato - Túbulo Distal

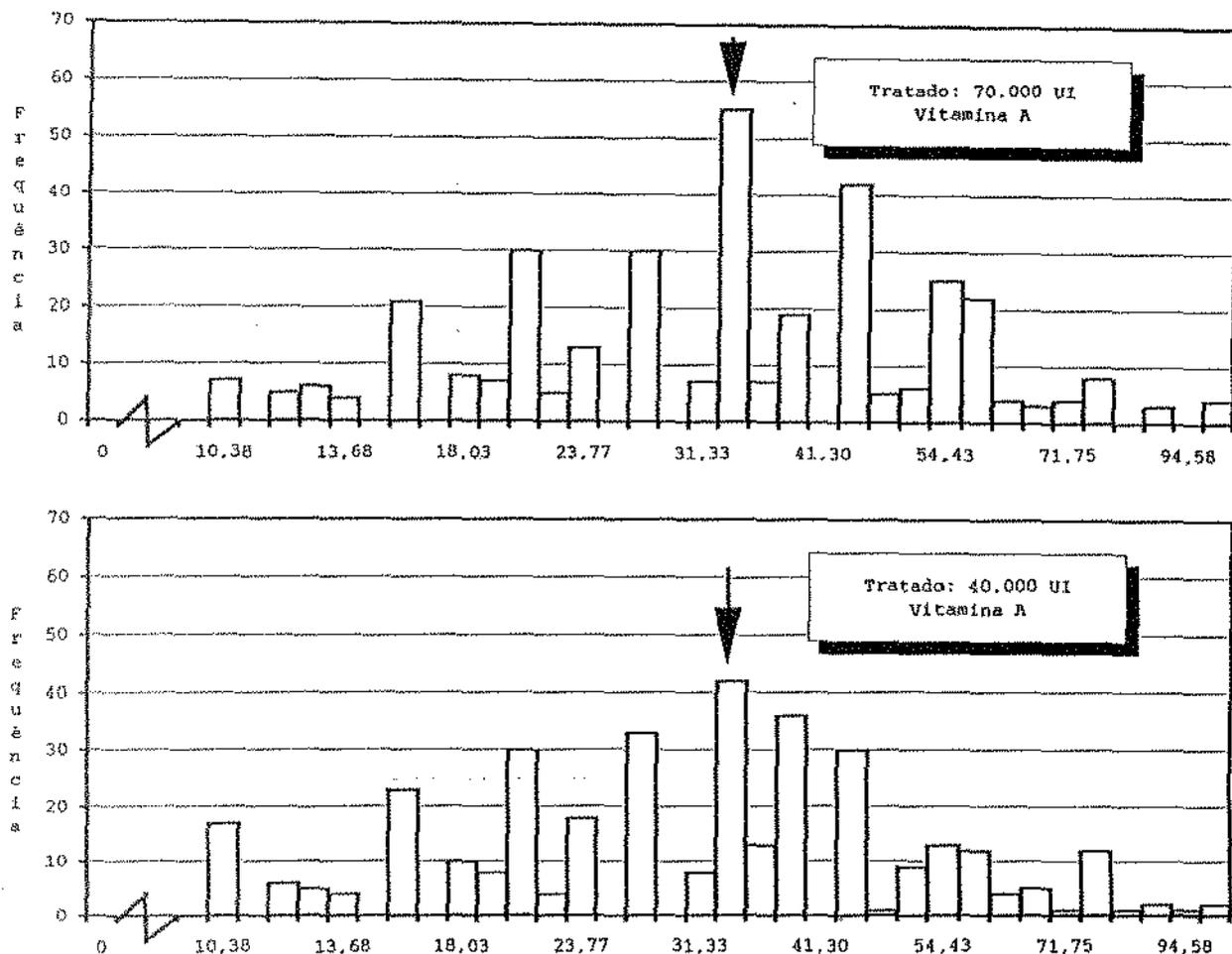


Figura 35 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 44 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	40.000 UI	70.000 UI	Total
Menores que a mediana	166	143	309
Maiores ou iguais a mediana	184	207	391
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 2,8041947$			

Rim de feto de rato - Túbulo Distal

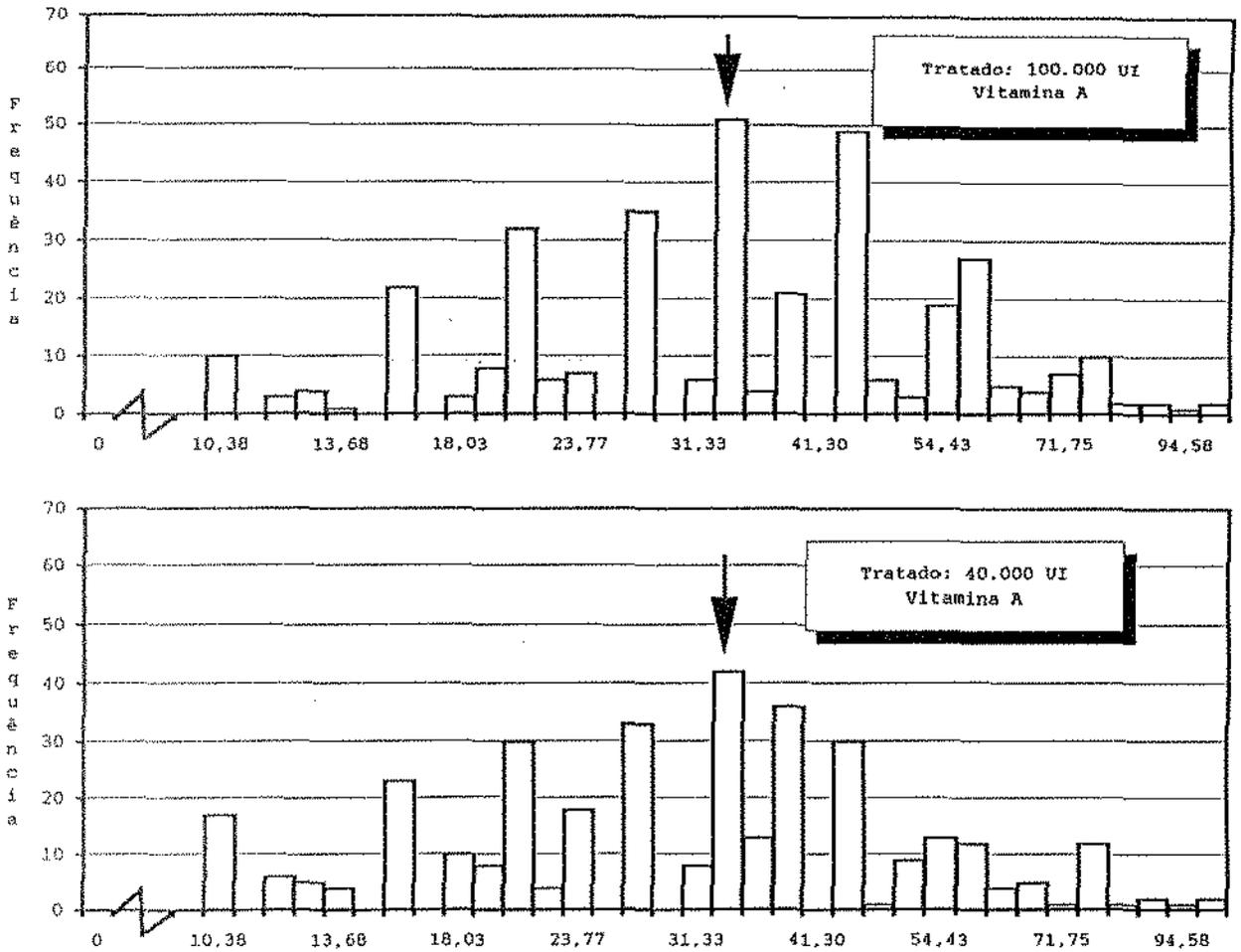


Figura 36 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 45 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	40.000 UI	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	166	137	303
Maiores ou iguais a mediana	184	213	397
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 4,56226983$			

Rim de feto de rato - Túbulo Distal

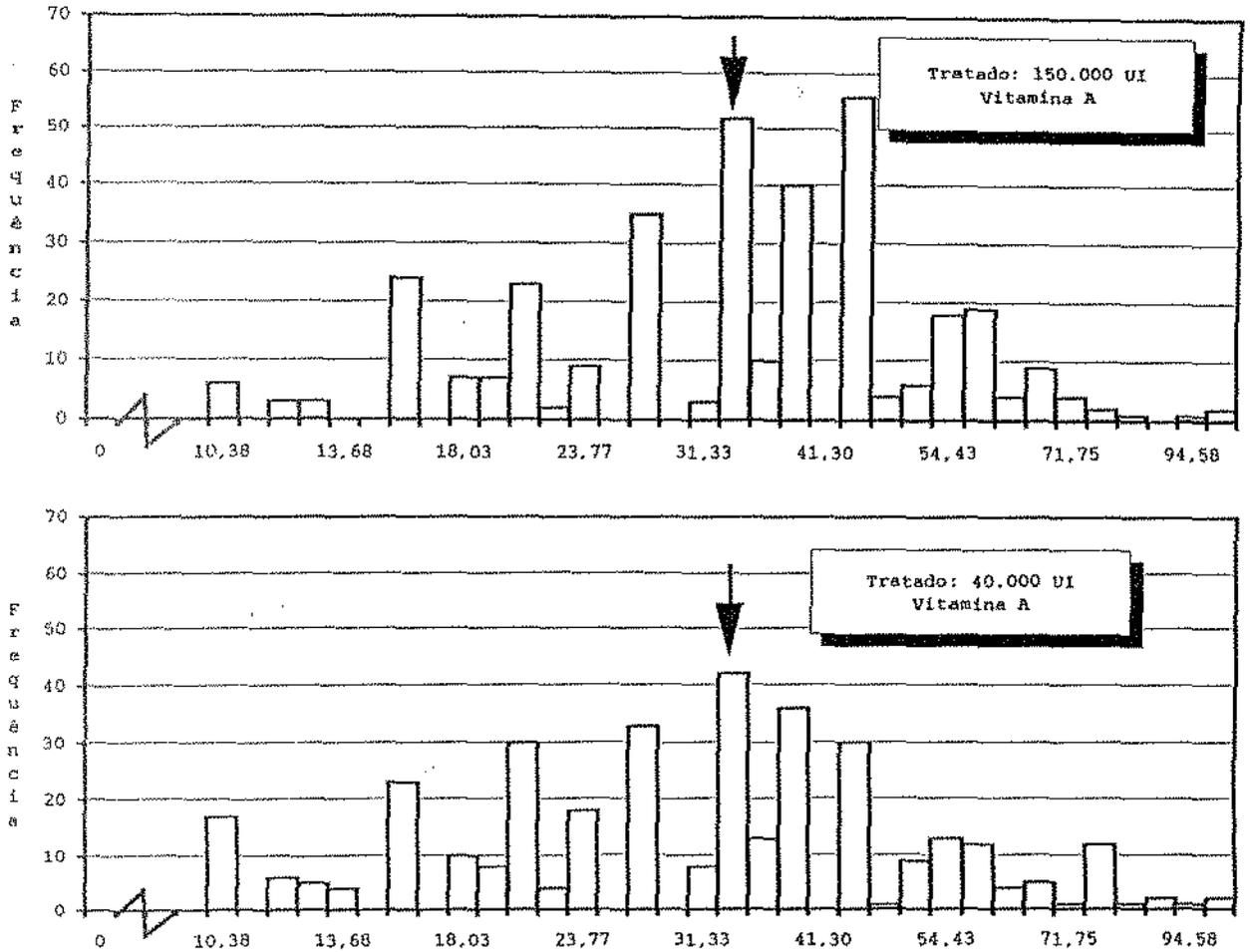


Figura 37 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 46 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	40.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	166	122	288
Maiores ou iguais a mediana	184	228	412
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 10,908003$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Distal

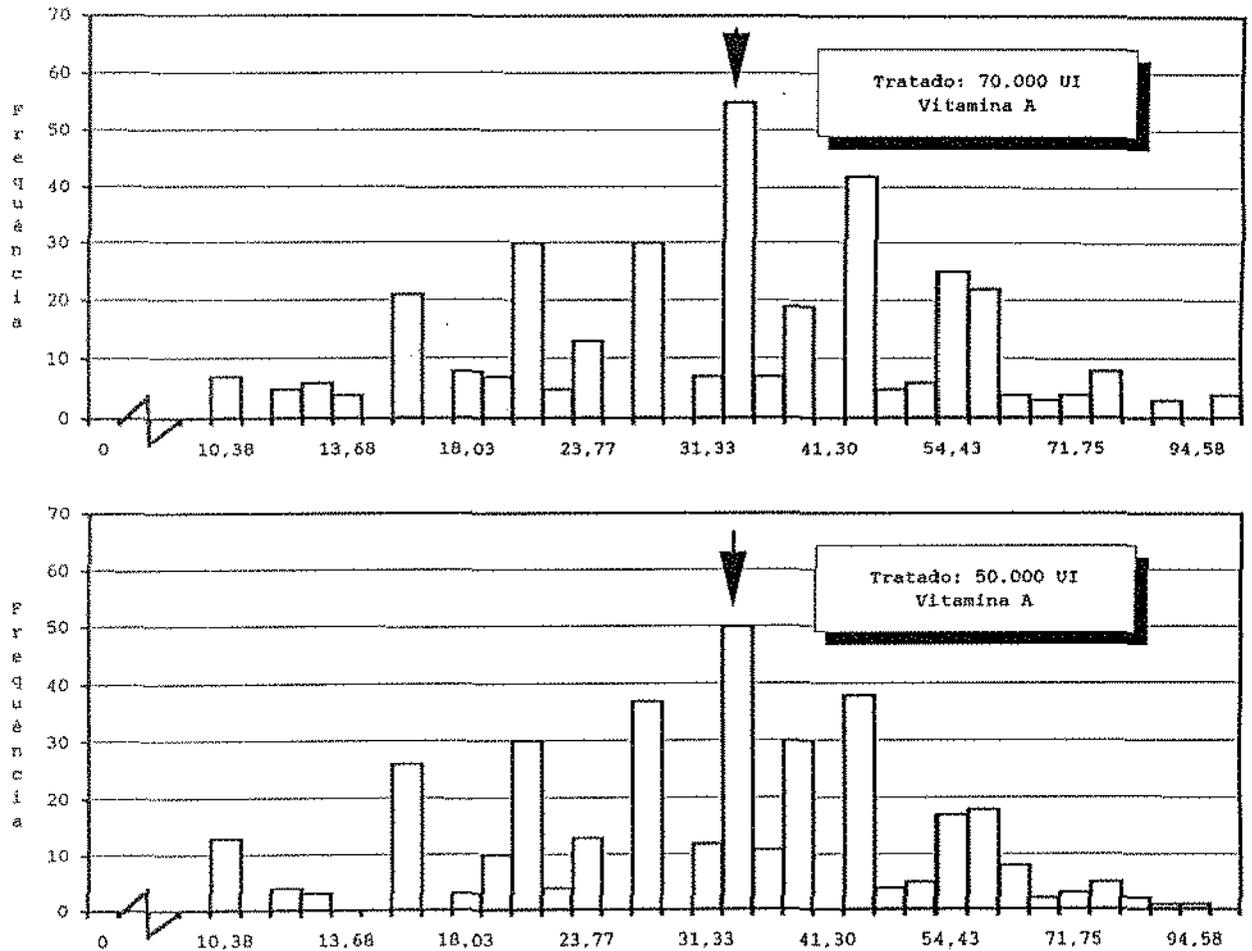


Figura 38 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 47 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	50.000 UI	70.000 UI	Total
Menores que a mediana	155	143	298
Maiores ou iguais a mediana	195	207	402
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 0,70703529$			

## Rim de feto de rato - Túbulo Distal

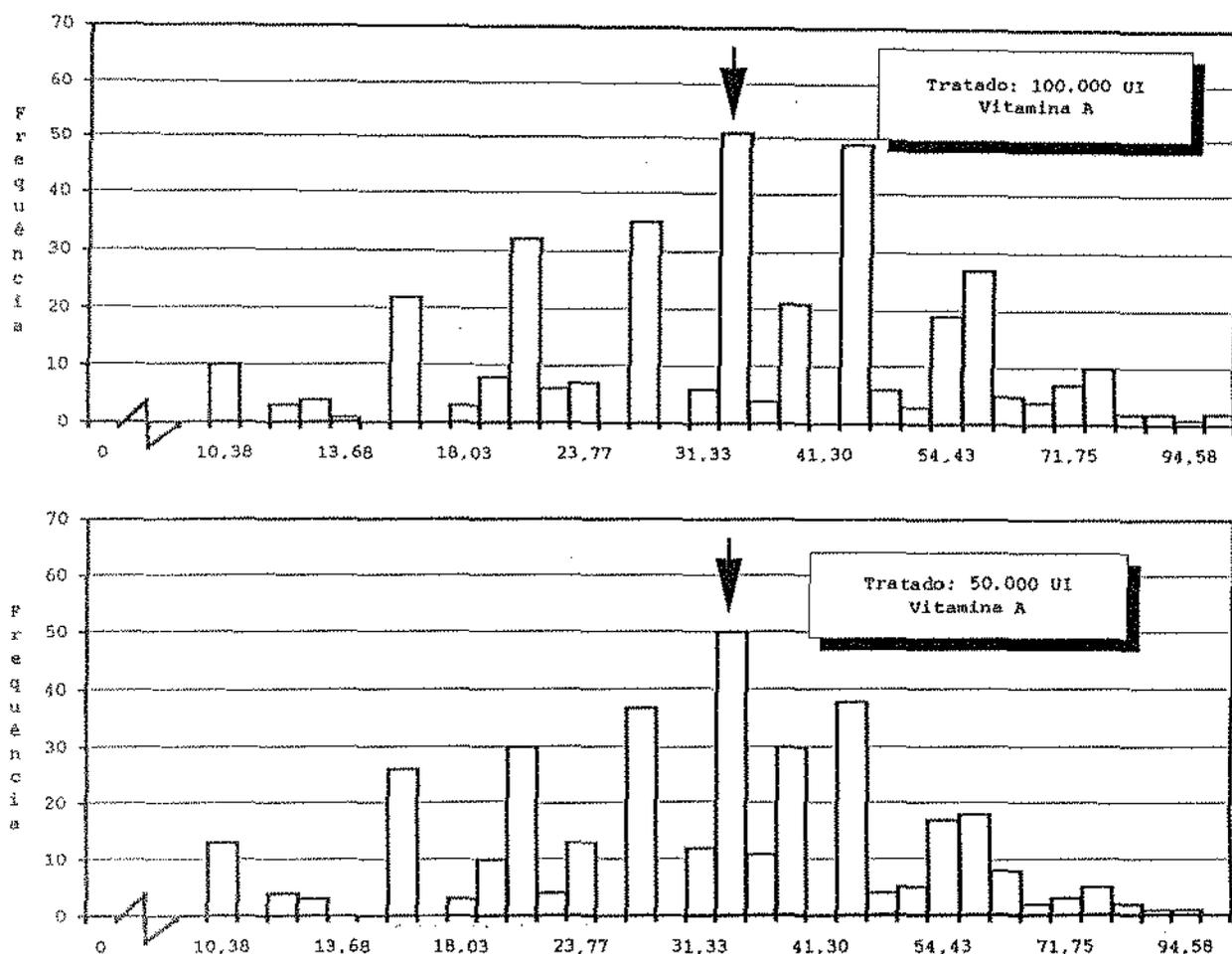


Figura 39 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 48 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	50.000 UI	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	155	137	292
Maiores ou iguais a mediana	195	213	408
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 1,69805936$			

## Rim de feto de rato - Túbulo Distal

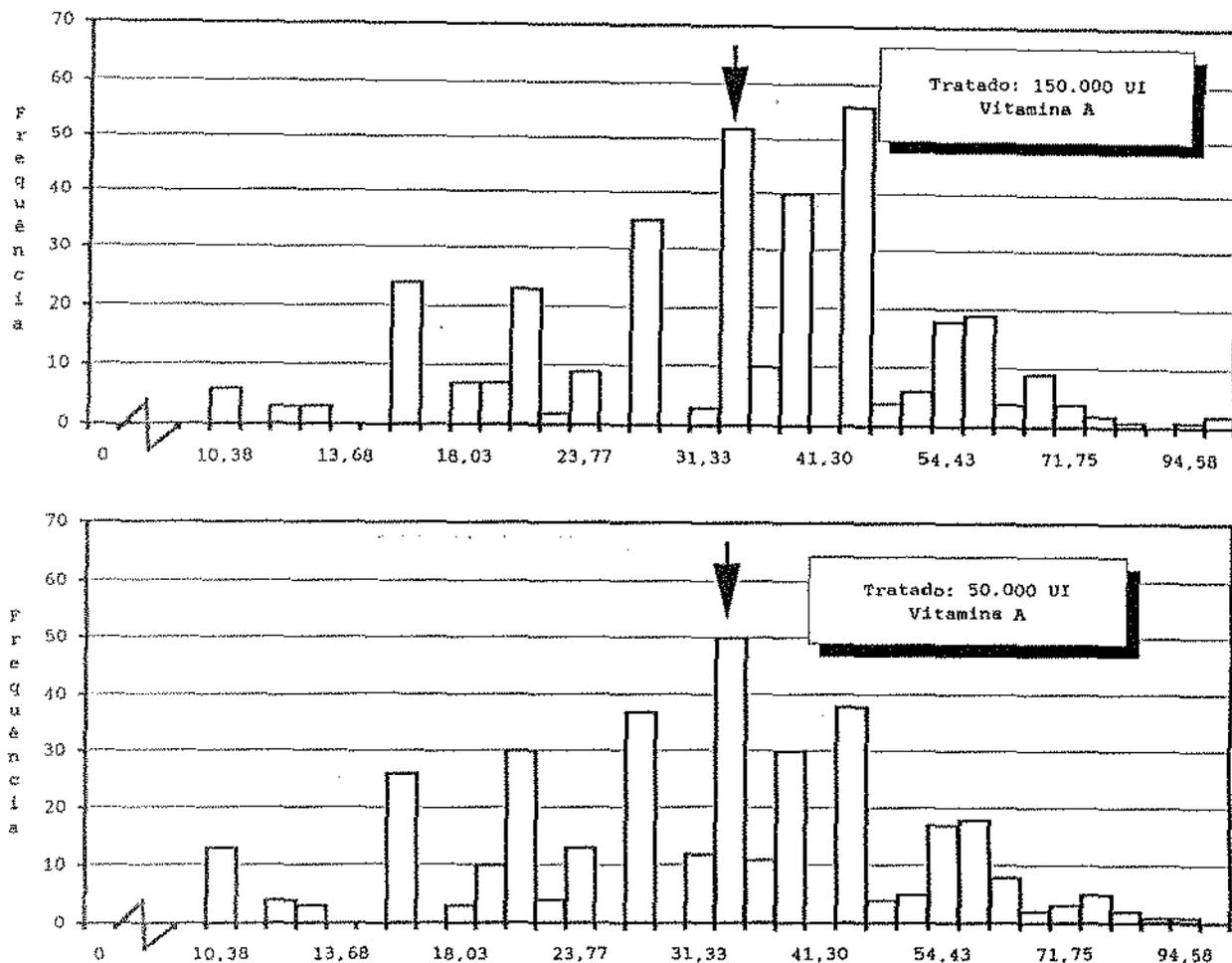


Figura 40 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 49 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	50.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	155	122	277
Maiores ou iguais a mediana	195	228	423
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 6,11755469 *$			

## Rim de feto de rato – Túbulo Distal

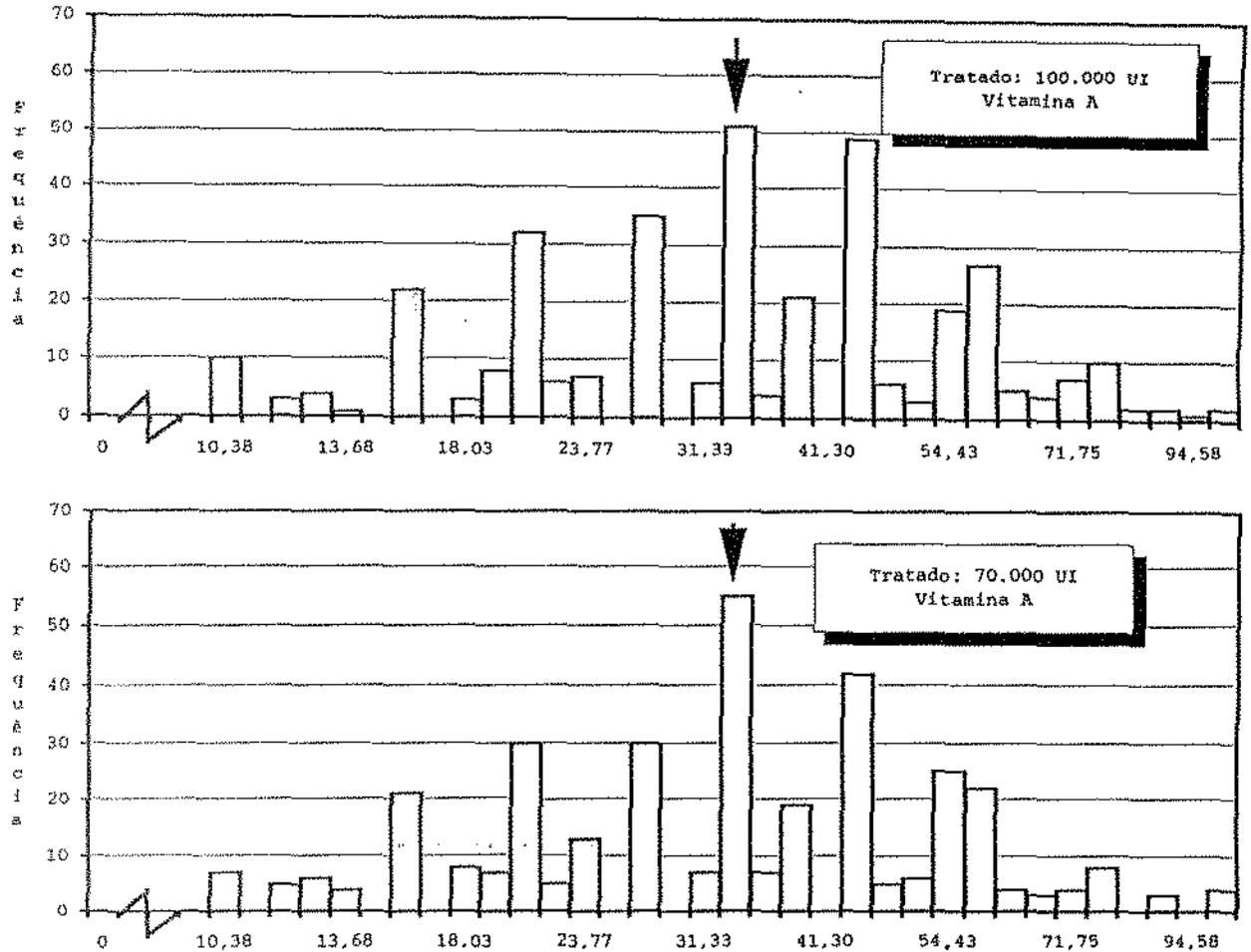


Figura 41 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 50 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	70.000 UI	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	143	137	280
Maiores ou iguais a mediana	207	213	420
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 0,14880952$			

### Rim de feto de rato - Túbulo Distal

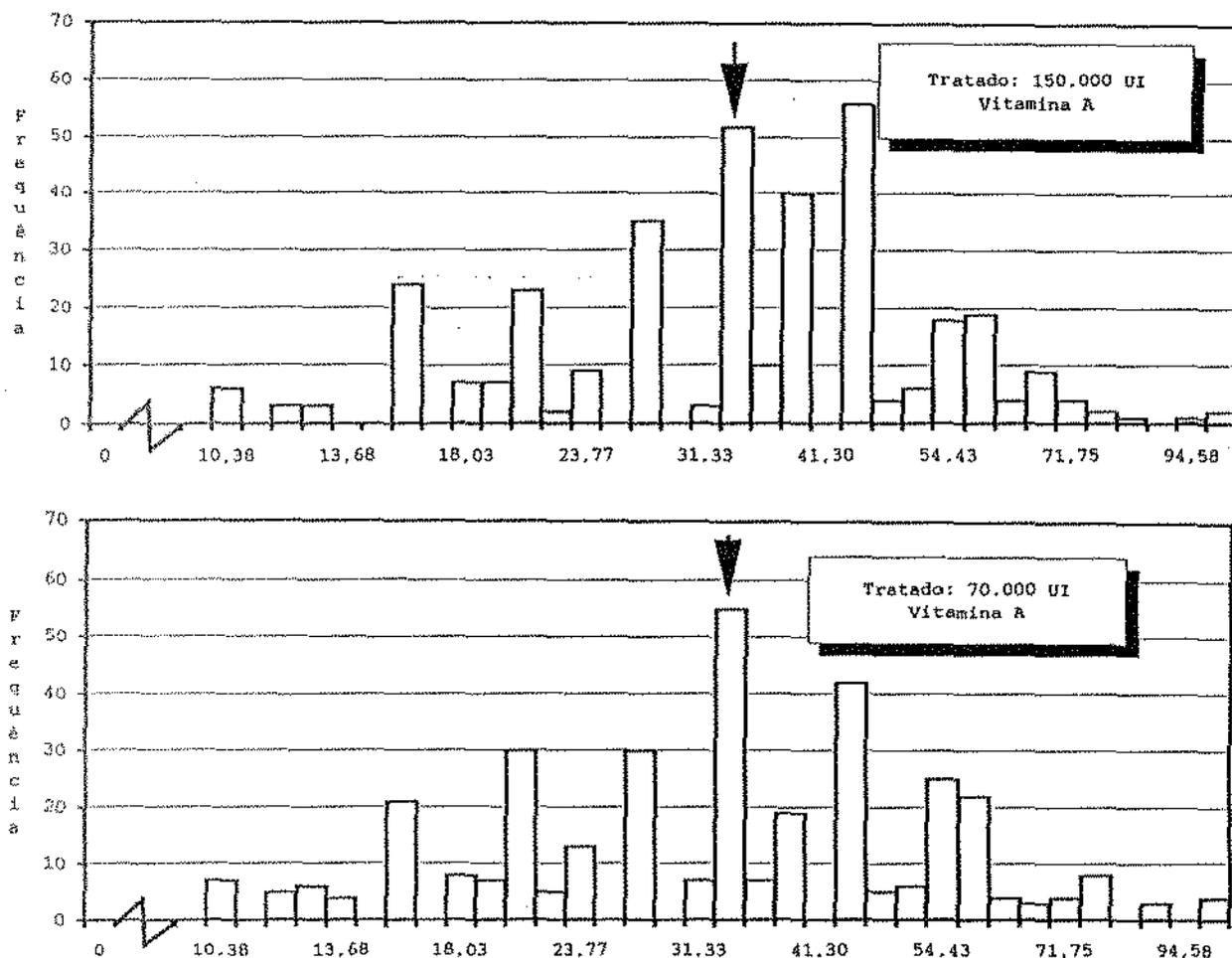


Figura 42 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 51 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	70.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	143	122	265
Maiores ou iguais a mediana	207	228	435
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 2,42897419$			

### Rim de feto de rato – Túbulo Distal

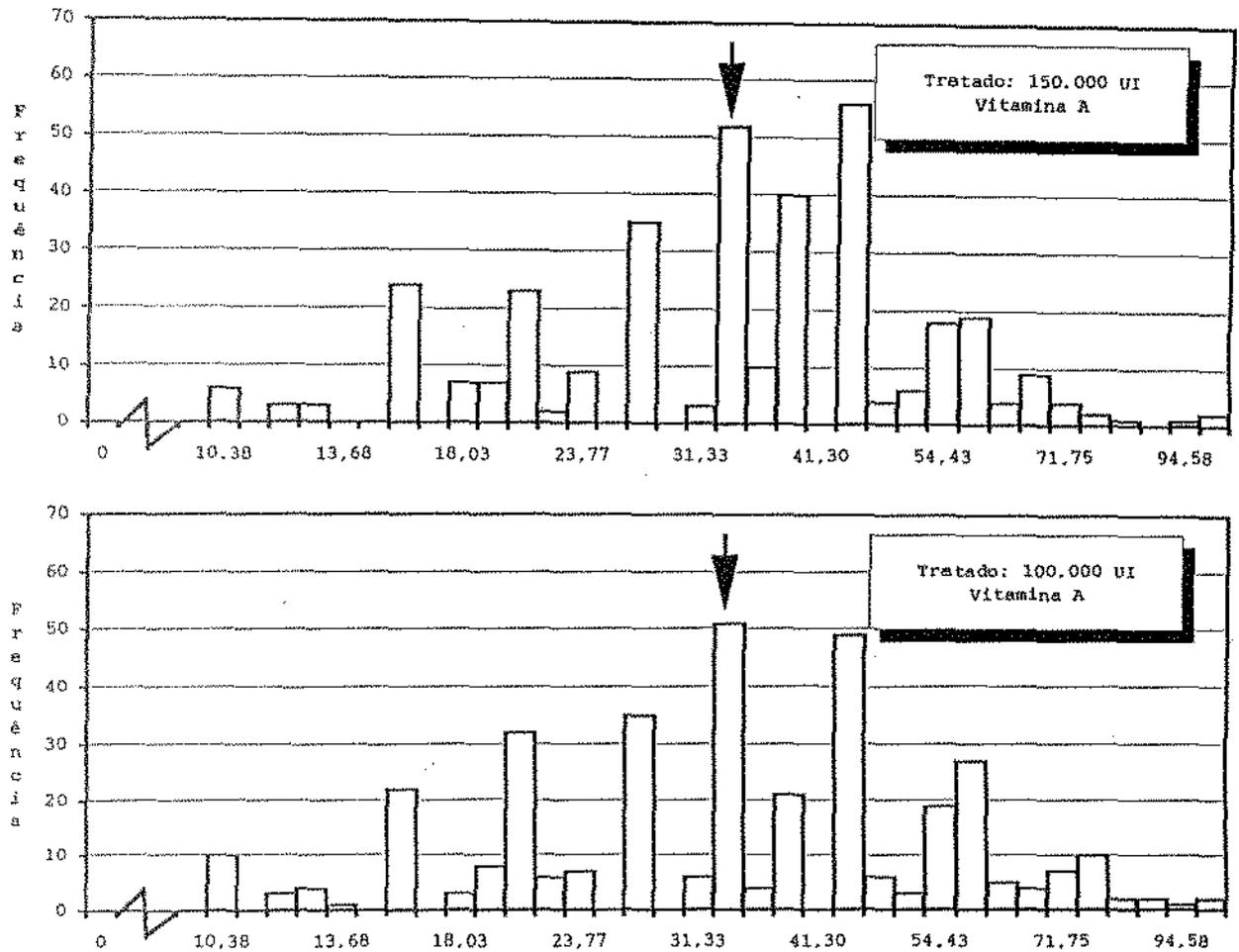


Figura 43 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 52 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	100.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	137	122	259
Maiores ou iguais a mediana	213	228	441
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 1,2012012$			

### Rim de feto de rato - Alça de Henle

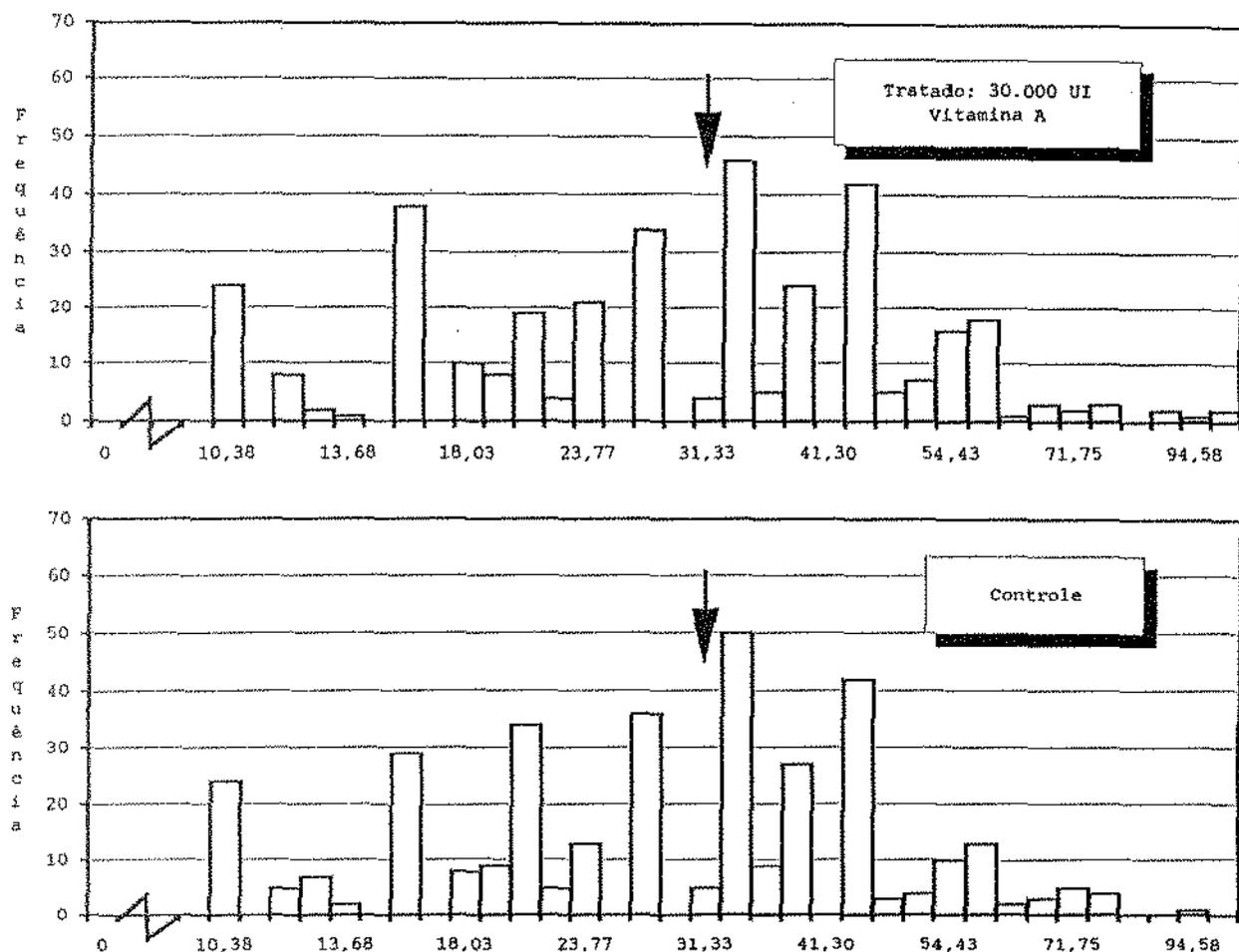


Figura 44 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 53 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	30.000 UI	Total
Menores que a mediana	172	169	341
Maiores ou iguais a mediana	178	181	359
Total	350	350	700
Mediana = 31,33			
$\chi^2 = 0,02287227$			

## Rim de feto de rato – Alça de Henle

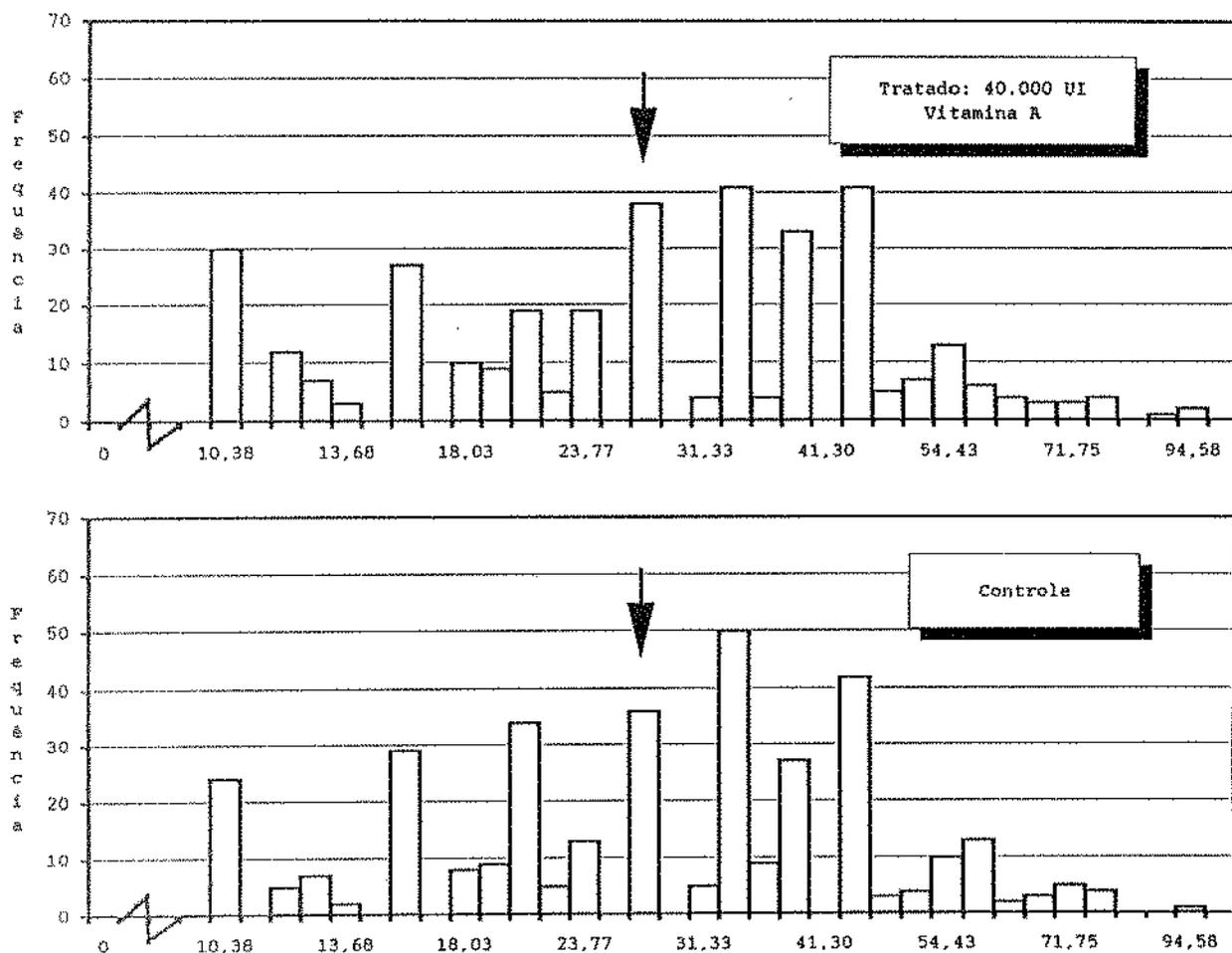


Figura 45 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 54 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	40.000 UI	Total
Menores que a mediana	136	141	277
Maiores ou iguais a mediana	214	209	423
Total	350	350	700
Mediana = 27,29			
$\chi^2 = 0,21507028$			

### Rim de feto de rato – Alça de Henle

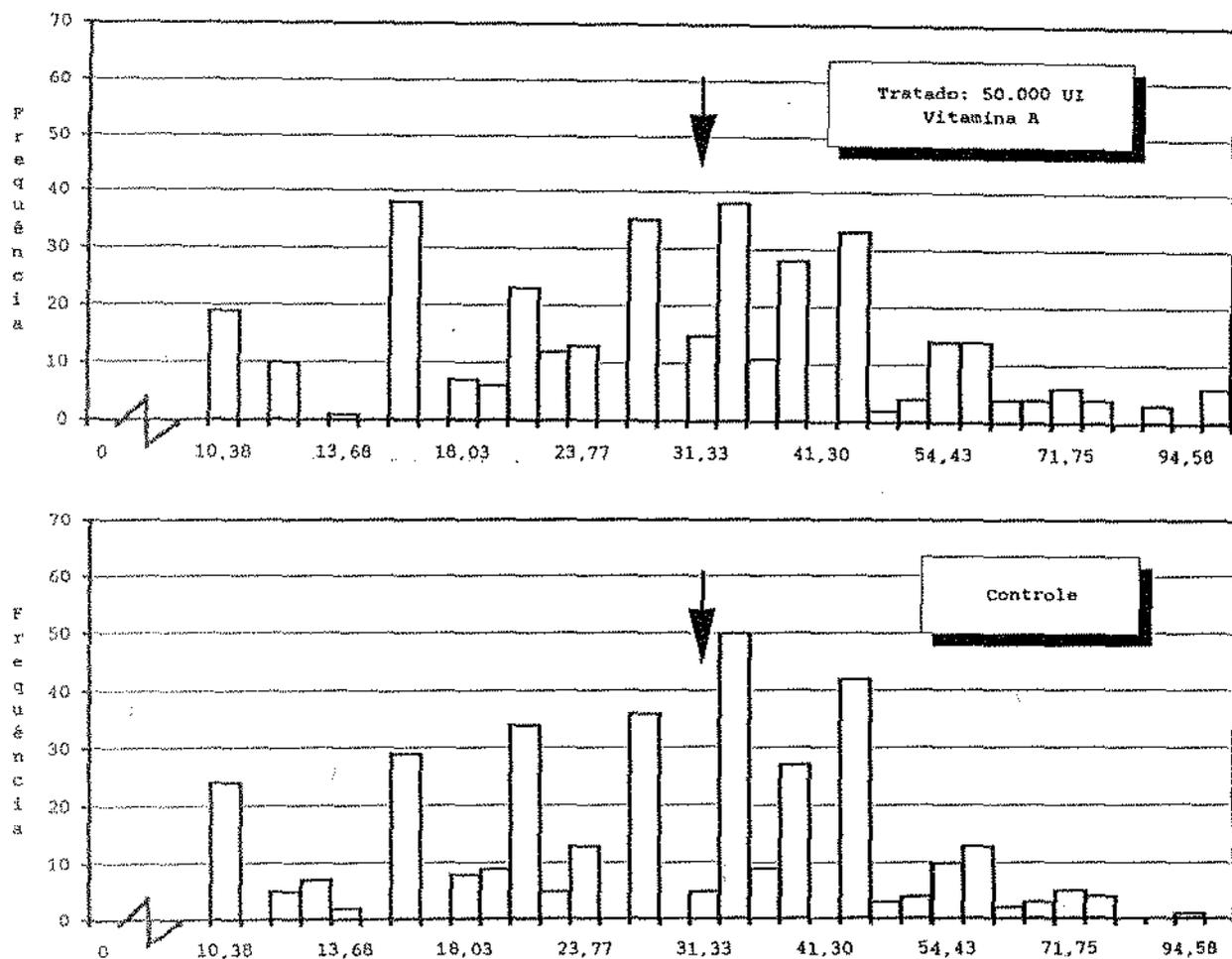


Figura 46 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 55 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	50.000 UI	Total
Menores que a mediana	172	164	336
Maiores ou iguais a mediana	178	186	364
Total	350	350	700
Mediana = 31,33			
$\chi^2 = 0,28044872$			

### Rim de feto de rato - Alça de Henle

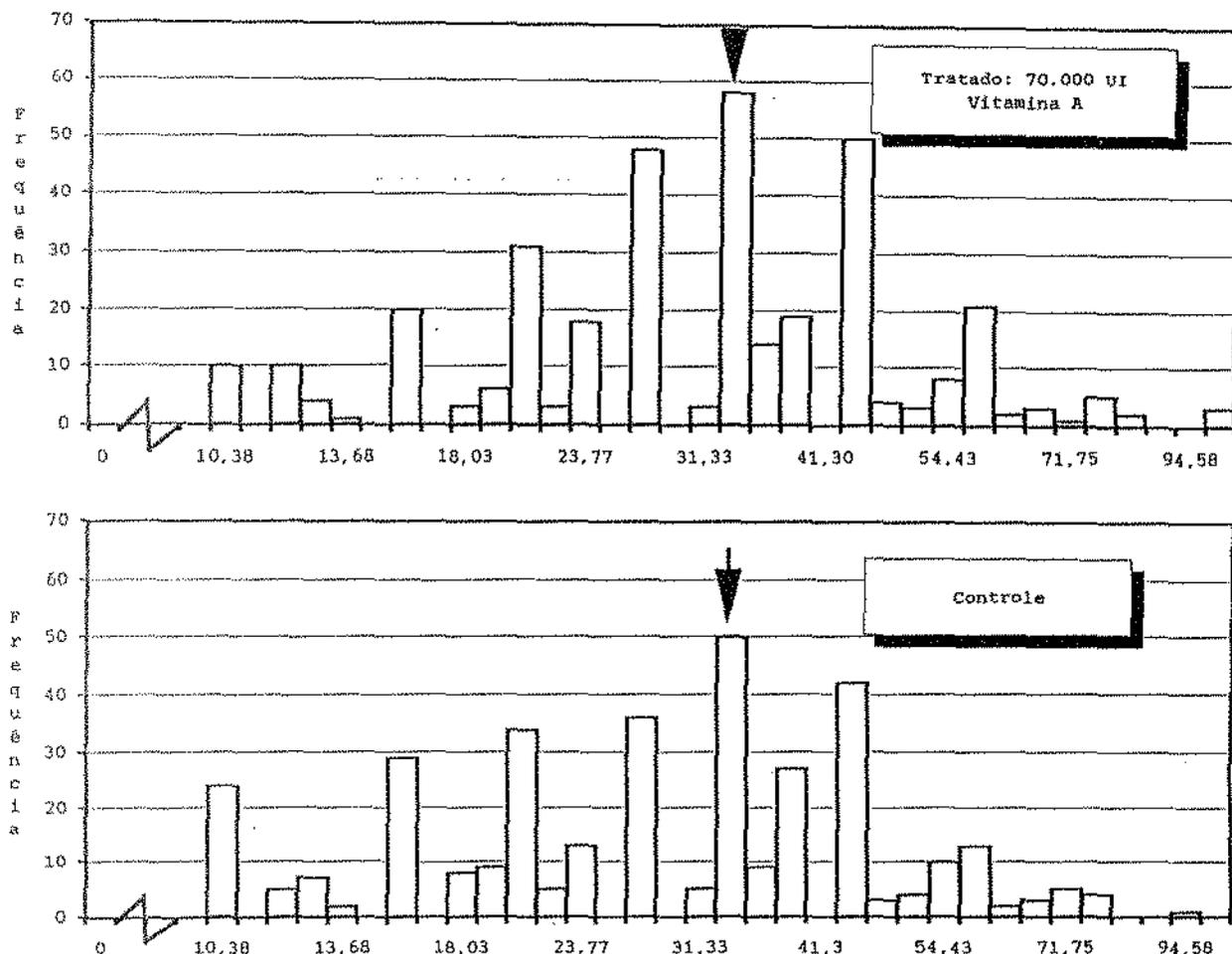


Figura 47 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 56 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	70.000 UI	Total
Menores que a mediana	177	157	334
Maiores ou iguais a mediana	173	193	366
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 2,06717712$			

## Rim de feto de rato - Alça de Henle

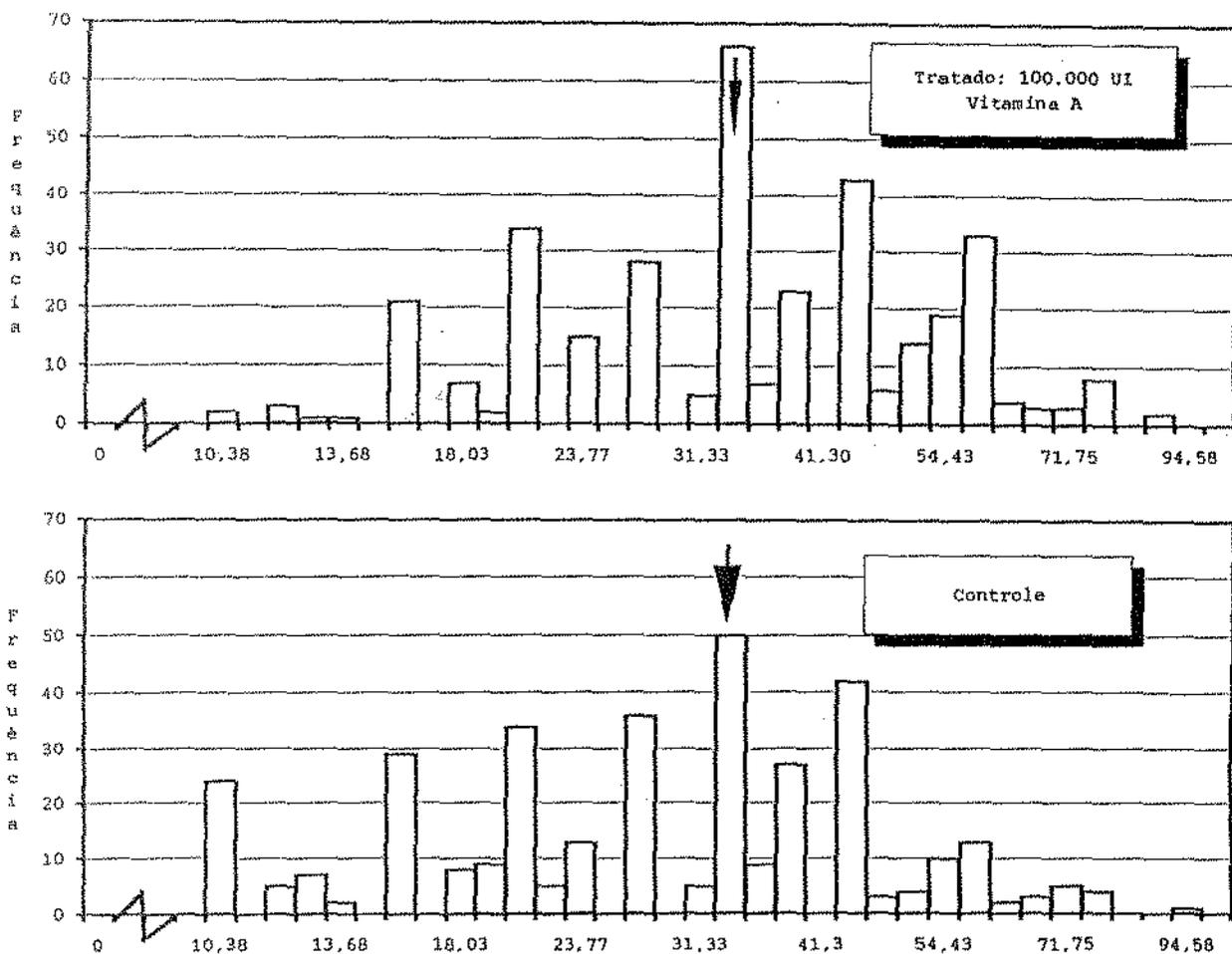


Figura 48 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 57 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	177	119	296
Maiores ou iguais a mediana	173	231	404
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 19,0184306 *$			

## Rim de feto de rato - Alça de Henle

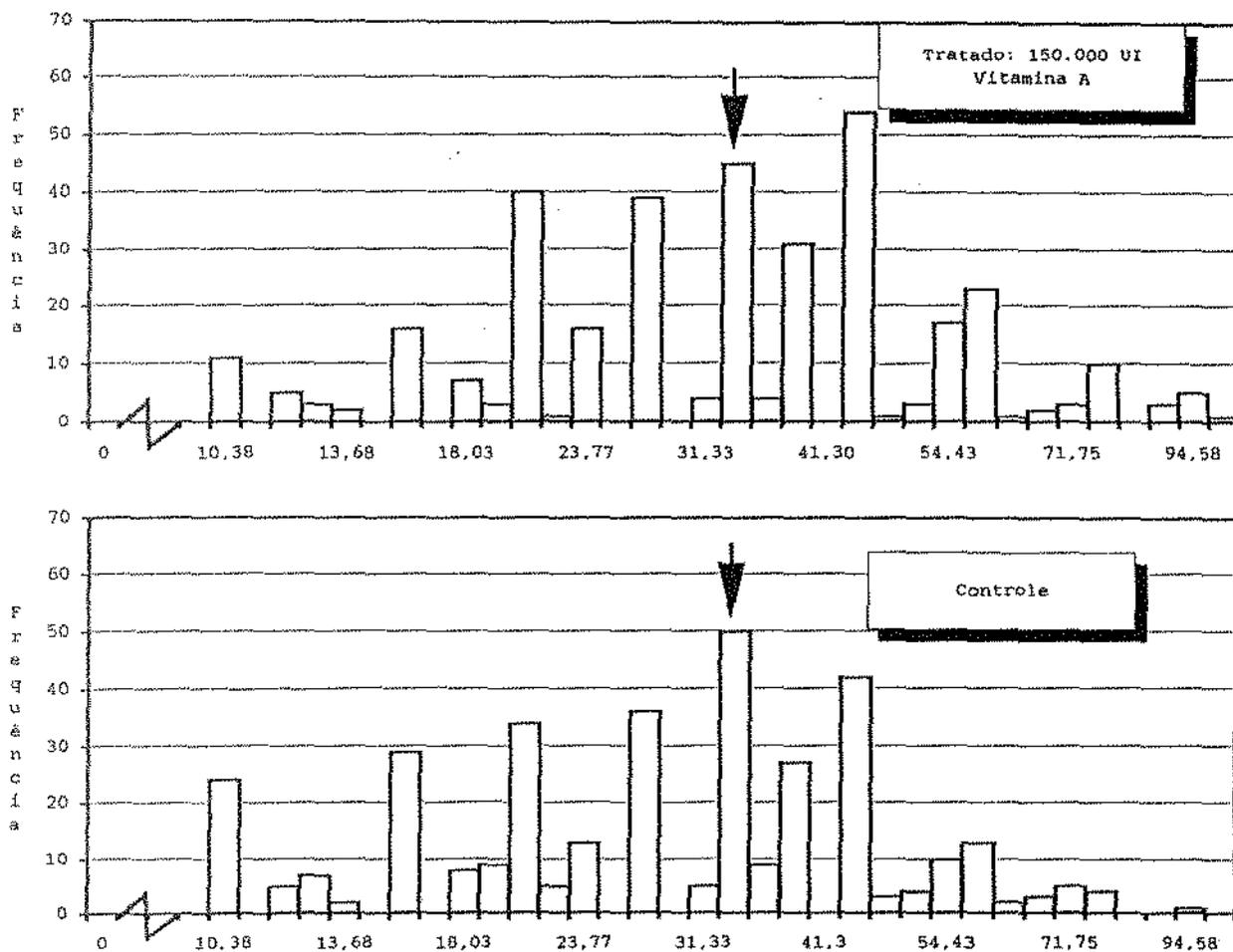


Figura 49 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 58 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	Controle	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	177	147	324
Maiores ou iguais a mediana	173	203	376
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 4,83238114 *$			

### Rim de feto de rato – Alça de Henle

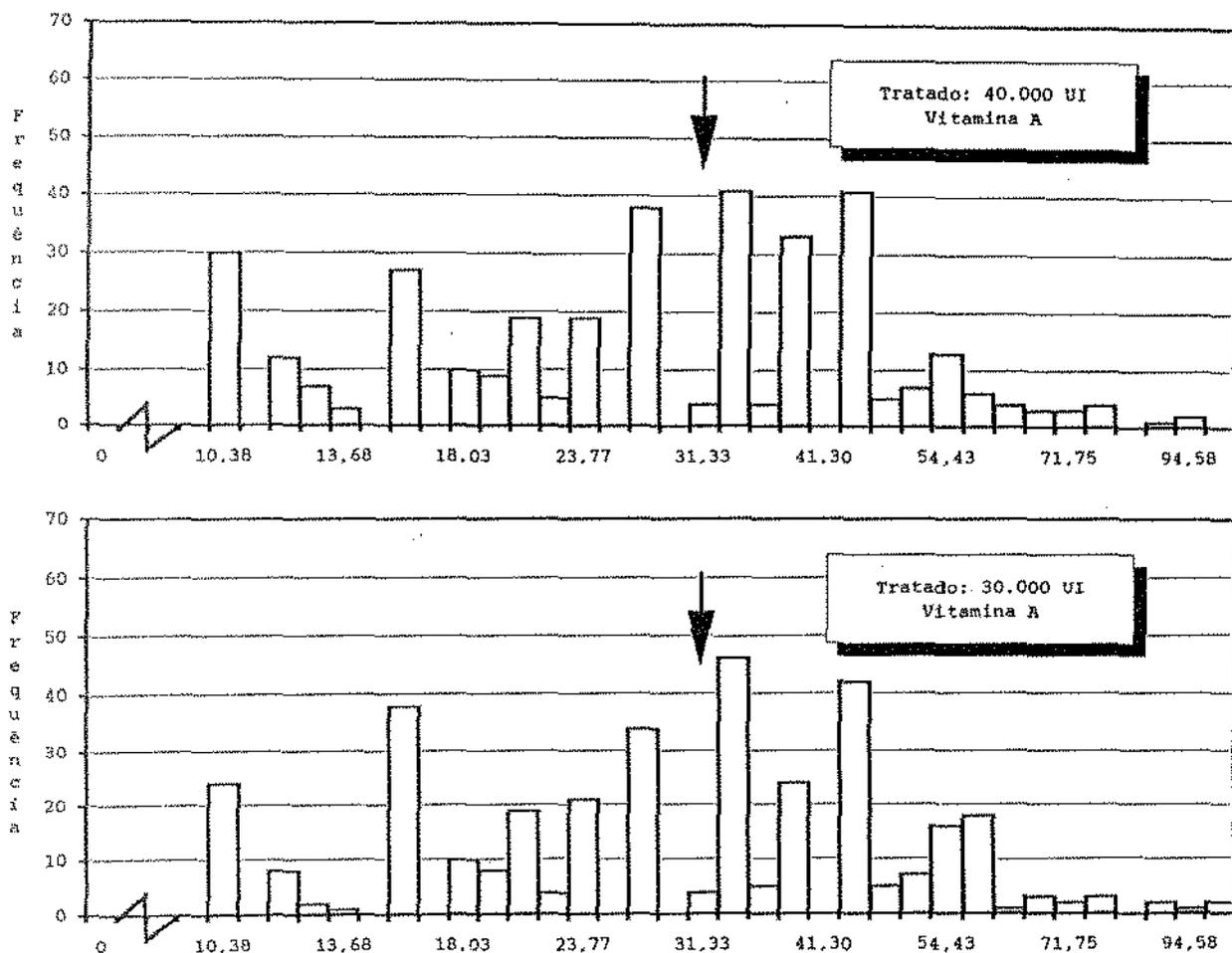


Figura 50 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 59 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	40.000 UI	Total
Menores que a mediana	169	179	348
Maiores ou iguais a mediana	181	171	352
Total	350	350	700
Mediana = 31,33			
$\chi^2 = 0,69145115$			

## Rim de feto de rato - Alça de Henle

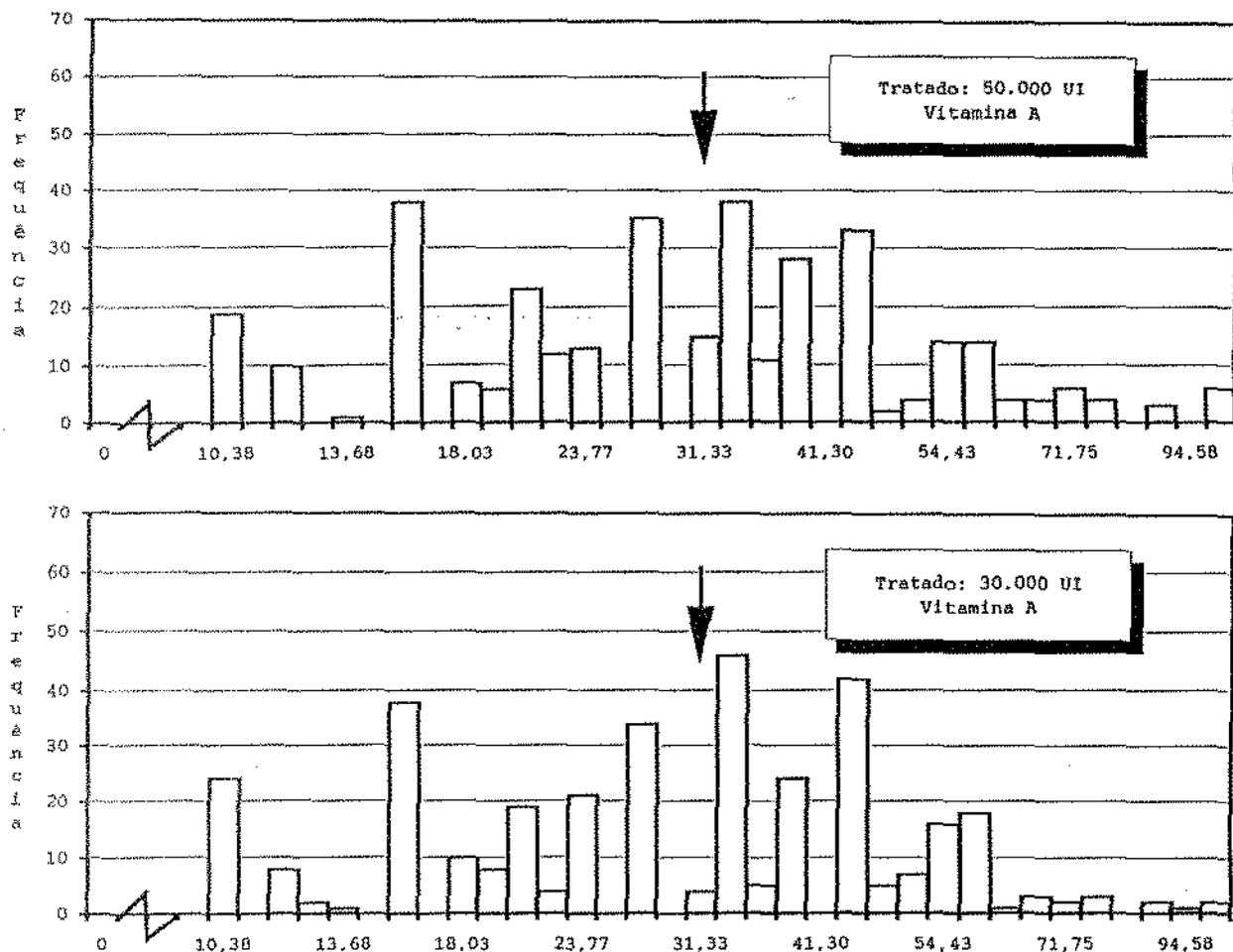


Figura 51 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 60 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	50.000 UI	Total
Menores que a mediana	169	164	333
Maiores ou iguais a mediana	181	186	367
Total	350	350	700
Mediana = 31,33			
$\chi^2 = 0,09164478$			

### Rim de feto de rato - Alça de Henle

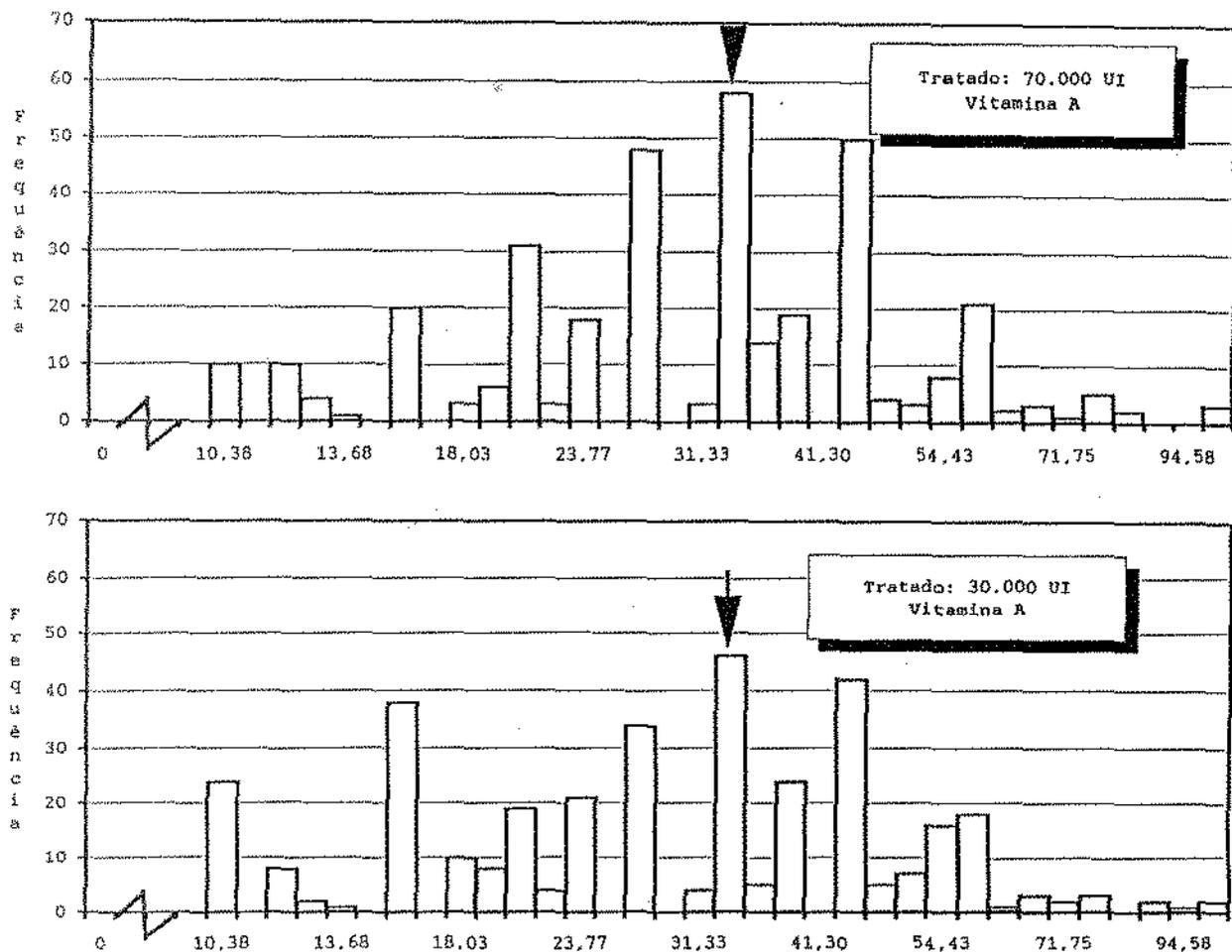


Figura 52 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 61 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	70.000 UI	Total
Menores que a mediana	173	157	330
Maiores ou iguais a mediana	177	193	370
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 1,28992629$			

## Rim de feto de rato - Alça de Henle

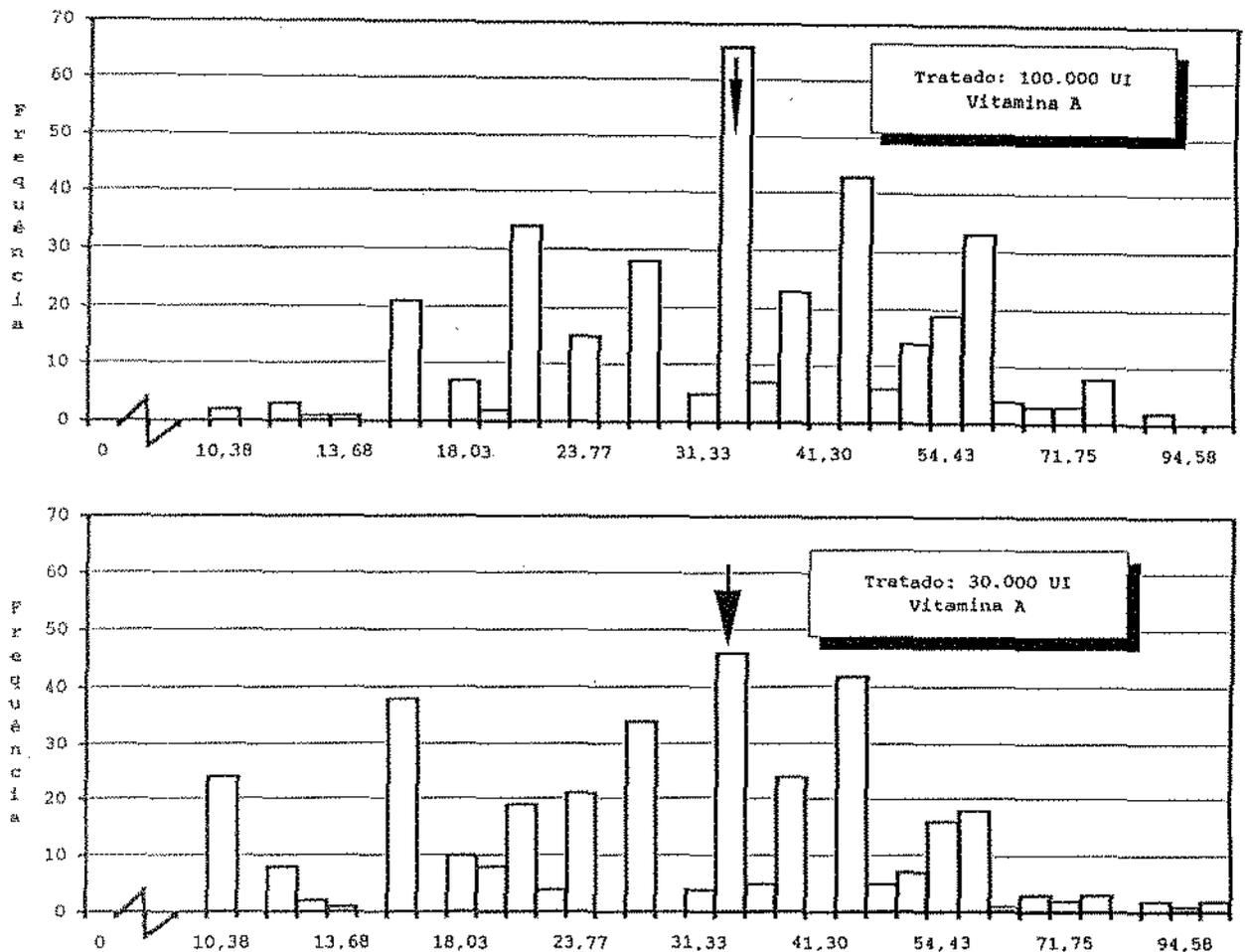


Figura 53 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 62 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	173	119	292
Maiores ou iguais a mediana	177	231	408
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 16,5046669 *$			

### Rim de feto de rato - Alça de Henle

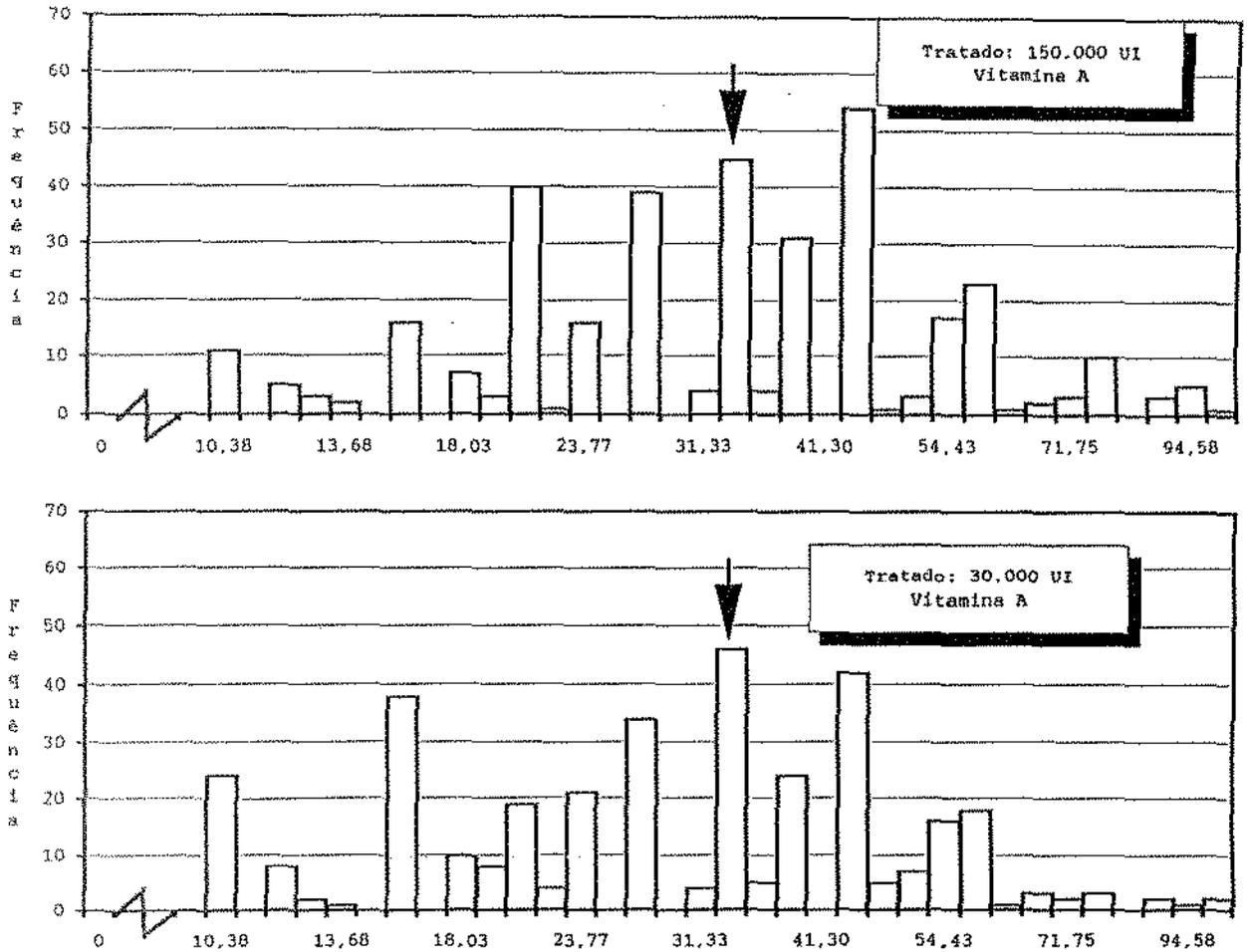


Figura 54 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 63 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	30.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	173	147	320
Maiores ou iguais a mediana	177	203	380
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 3,59786184$			

Rim de feto de rato - Alça de Henle

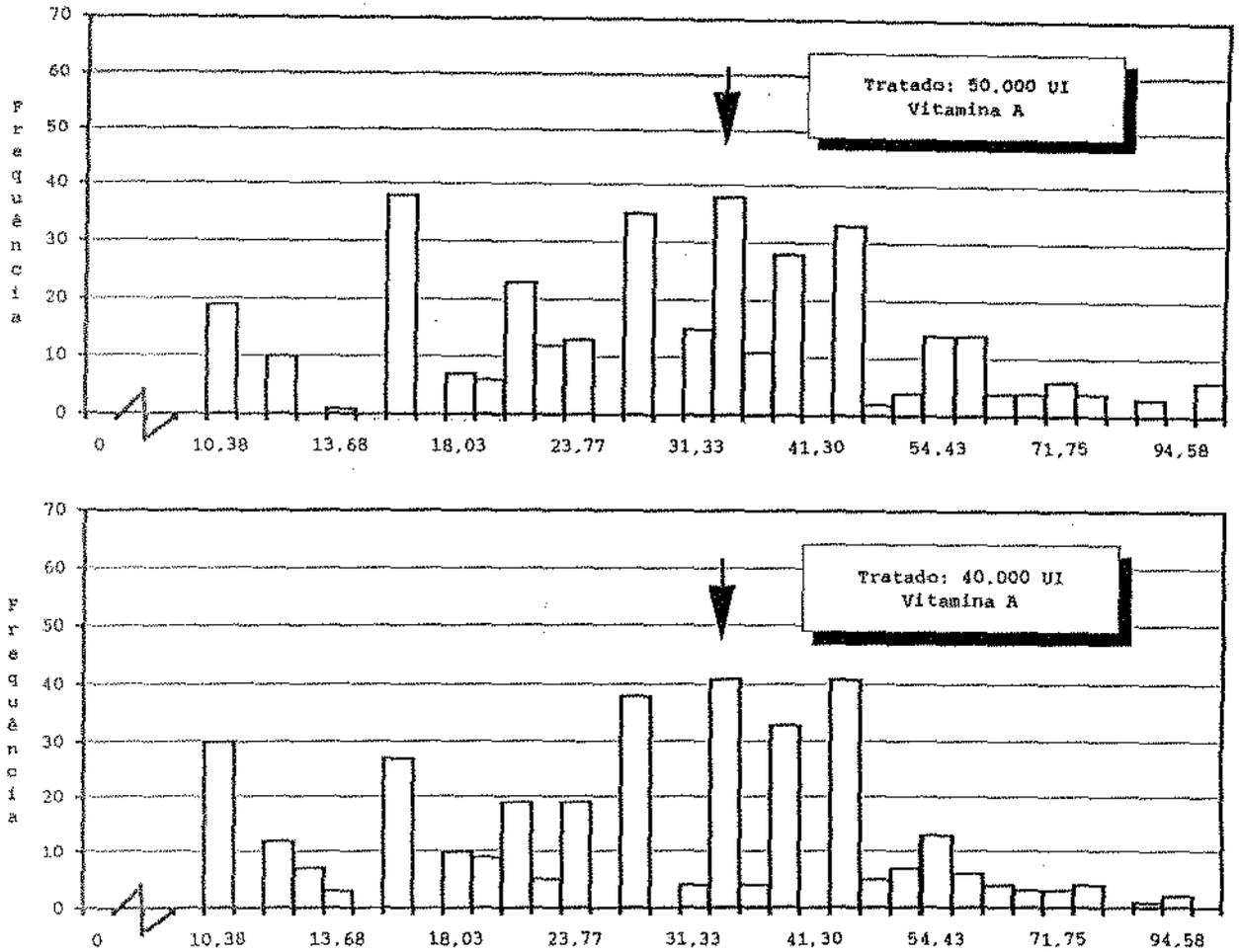


Figura 55 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 64 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	40.000 UI	50.000 UI	Total
Menores que a mediana	141	129	270
Maiores ou iguais a mediana	209	221	430
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 0,7295435$			

Rim de feto de rato - Alça de Henle

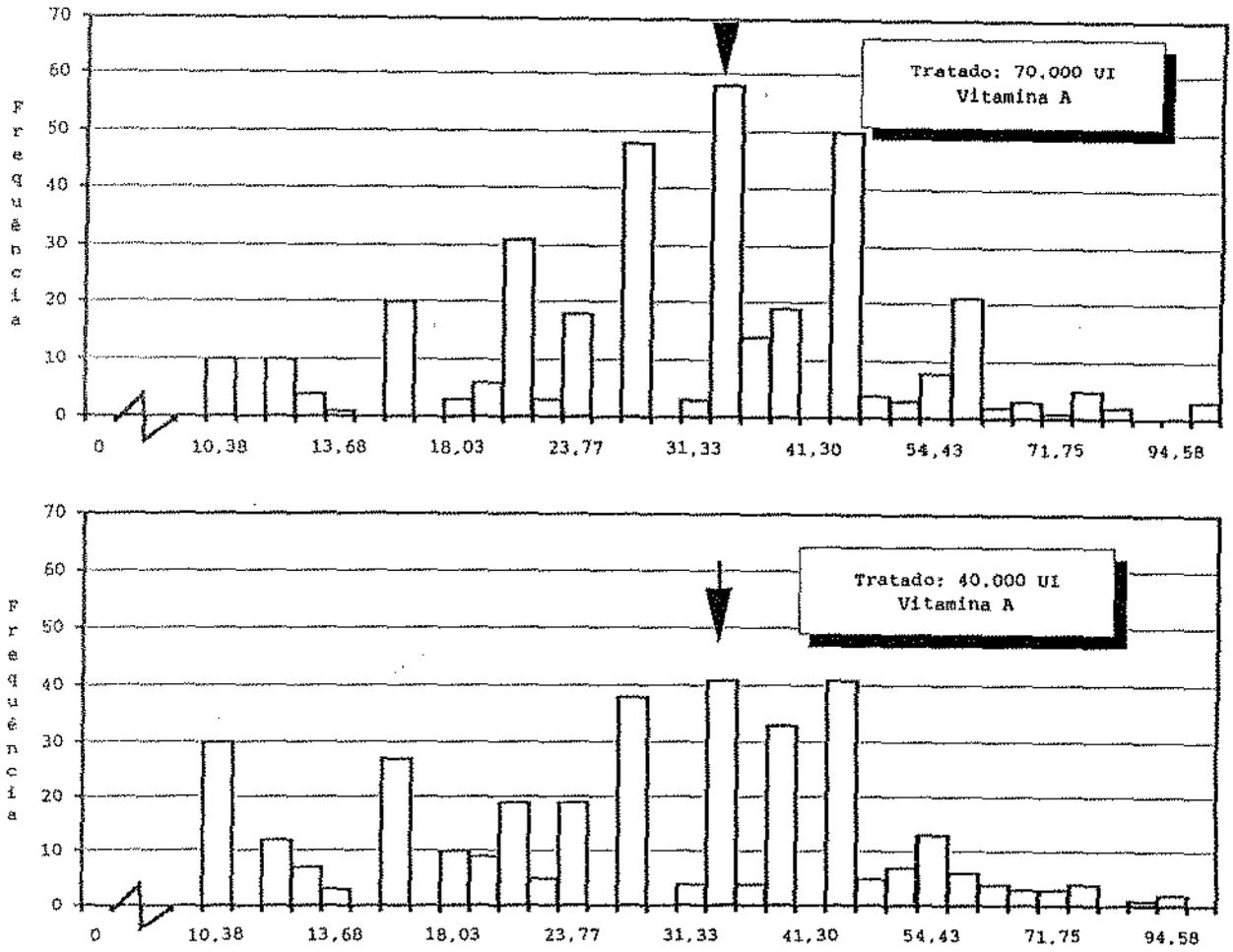


Figura 56 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 65 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	40.000 UI	70.000 UI	Total
Menores que a mediana	179	164	343
Maiores ou iguais a mediana	171	186	357
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 1,12044818$			

## Rim de feto de rato - Alça de Henle

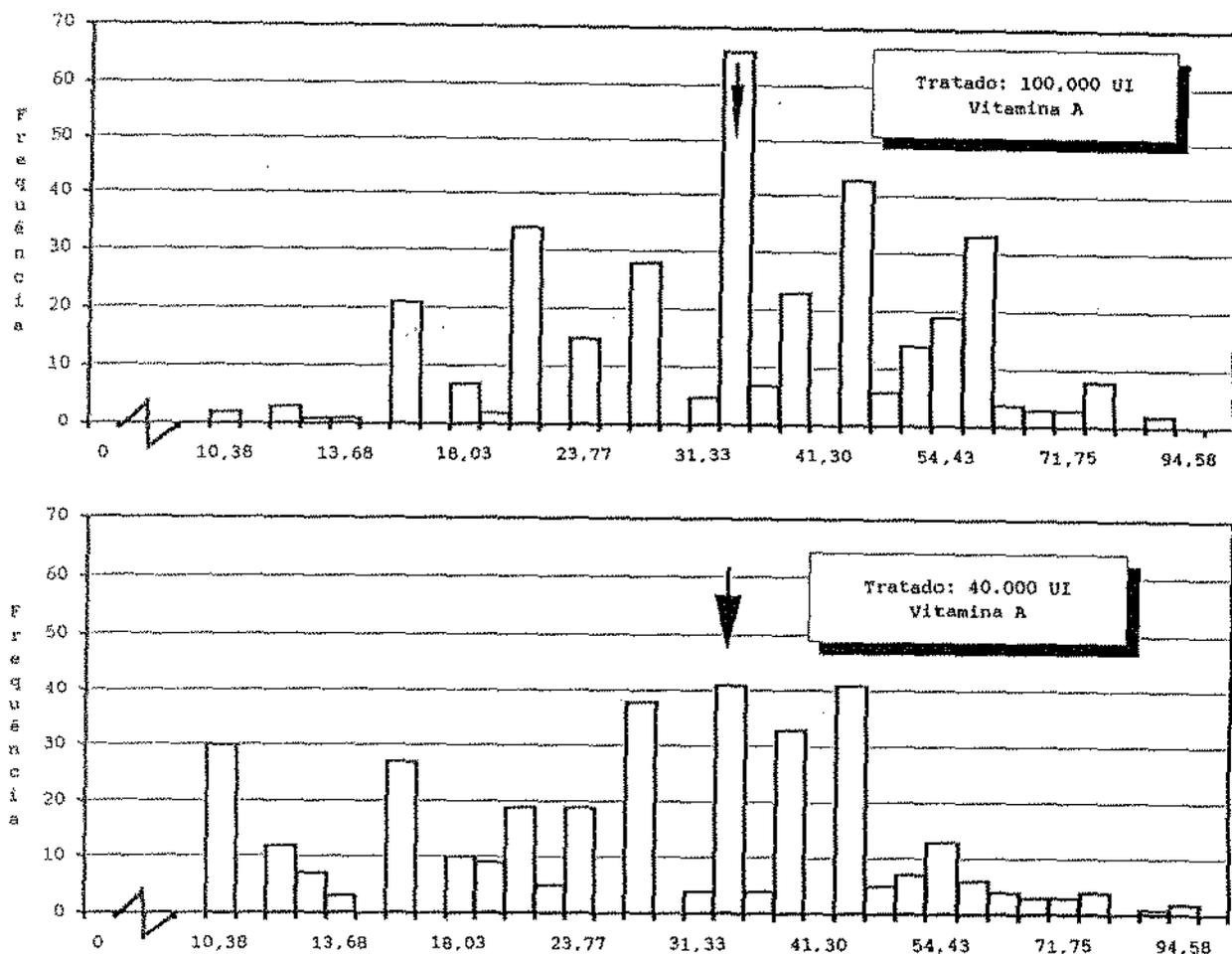


Figura 57 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 66 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	40.000 UI	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	183	119	302
Maiores ou iguais a mediana	167	231	398
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 23,1147459 *$			

Rim de feto de rato – Alça de Henle

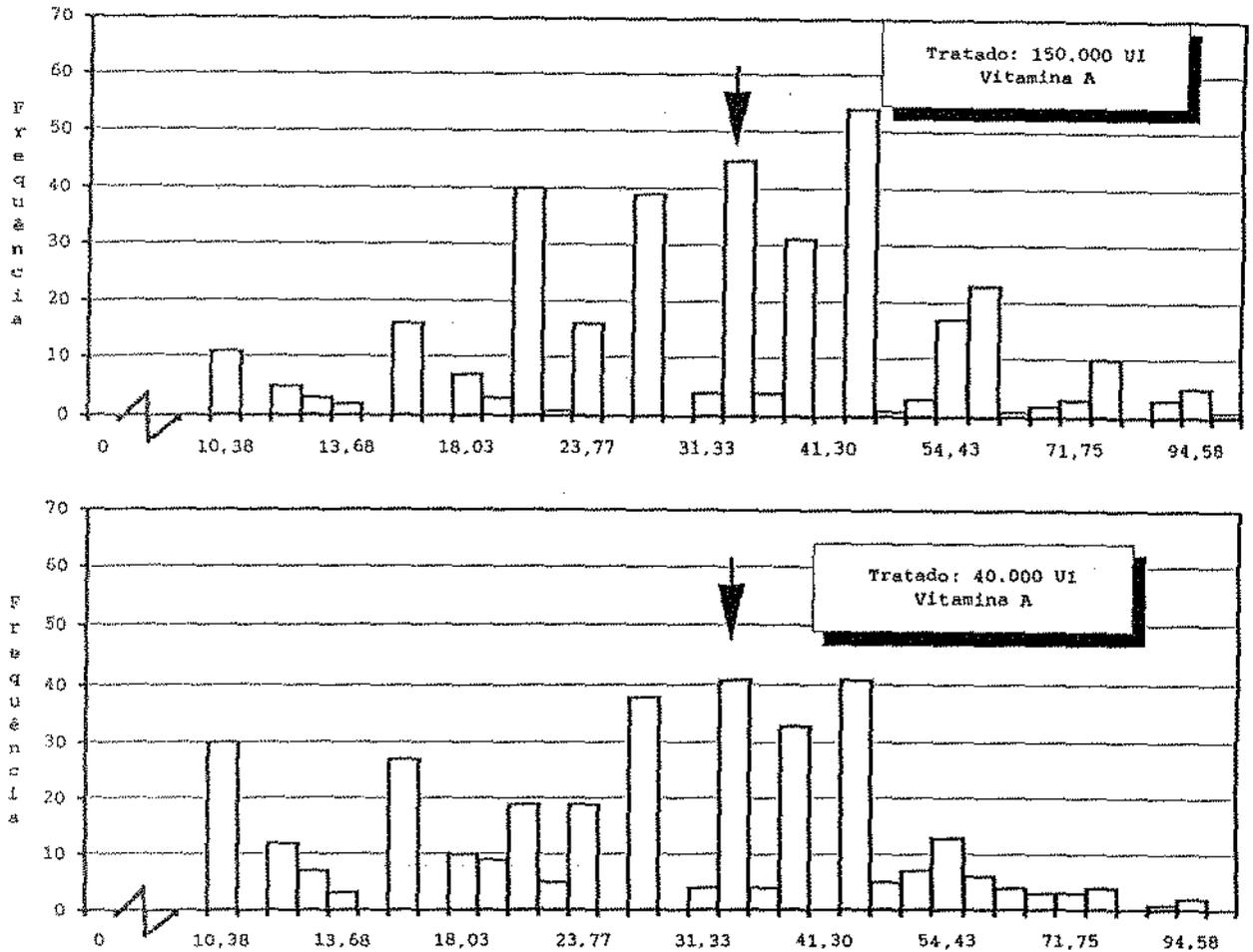


Figura 58 – Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 67 – Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	40.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	183	147	330
Maiores ou iguais a mediana	167	203	370
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 7,02293202 *$			

### Rim de feto de rato - Alça de Henle

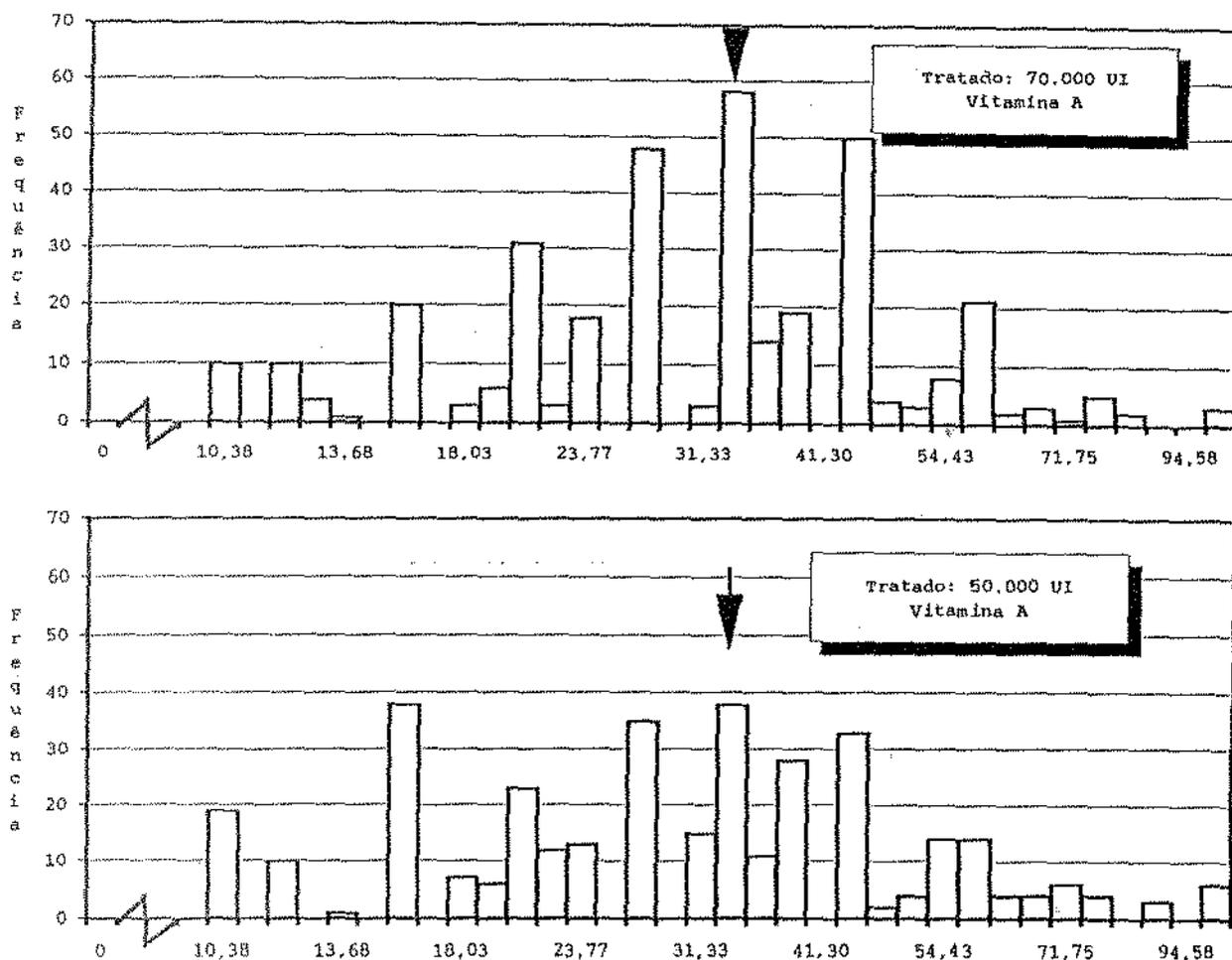


Figura 59 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 68 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	50.000 UI	70.000 UI	Total
Menores que a mediana	179	157	336
Maiores ou iguais a mediana	171	193	364
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 2,52403846$			

### Rim de feto de rato - Alça de Henle

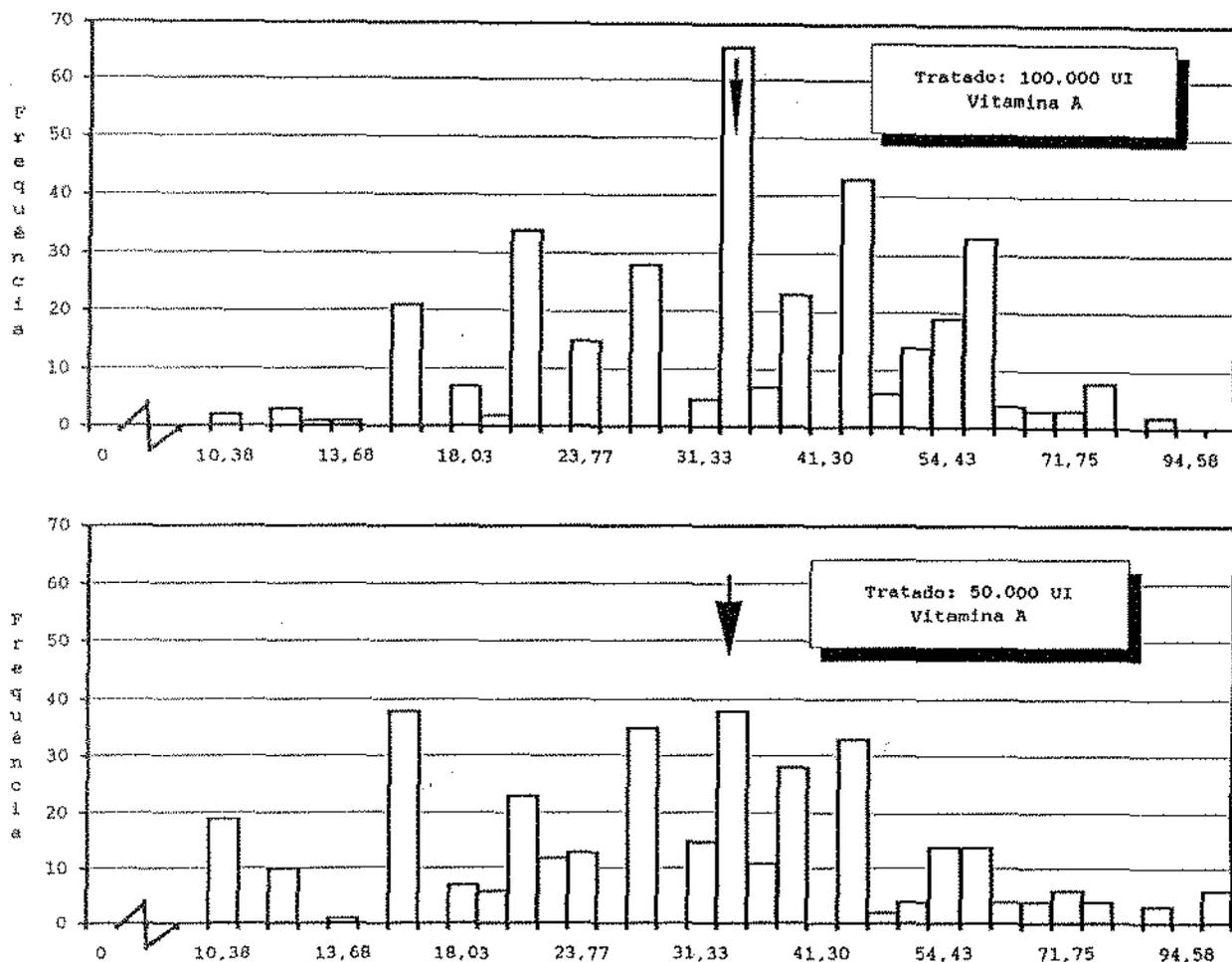


Figura 60 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 69 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	50.000 UI	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	179	119	298
Maiores ou iguais a mediana	171	231	402
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 20,340412 *$			

Rim de feto de rato - Alça de Henle

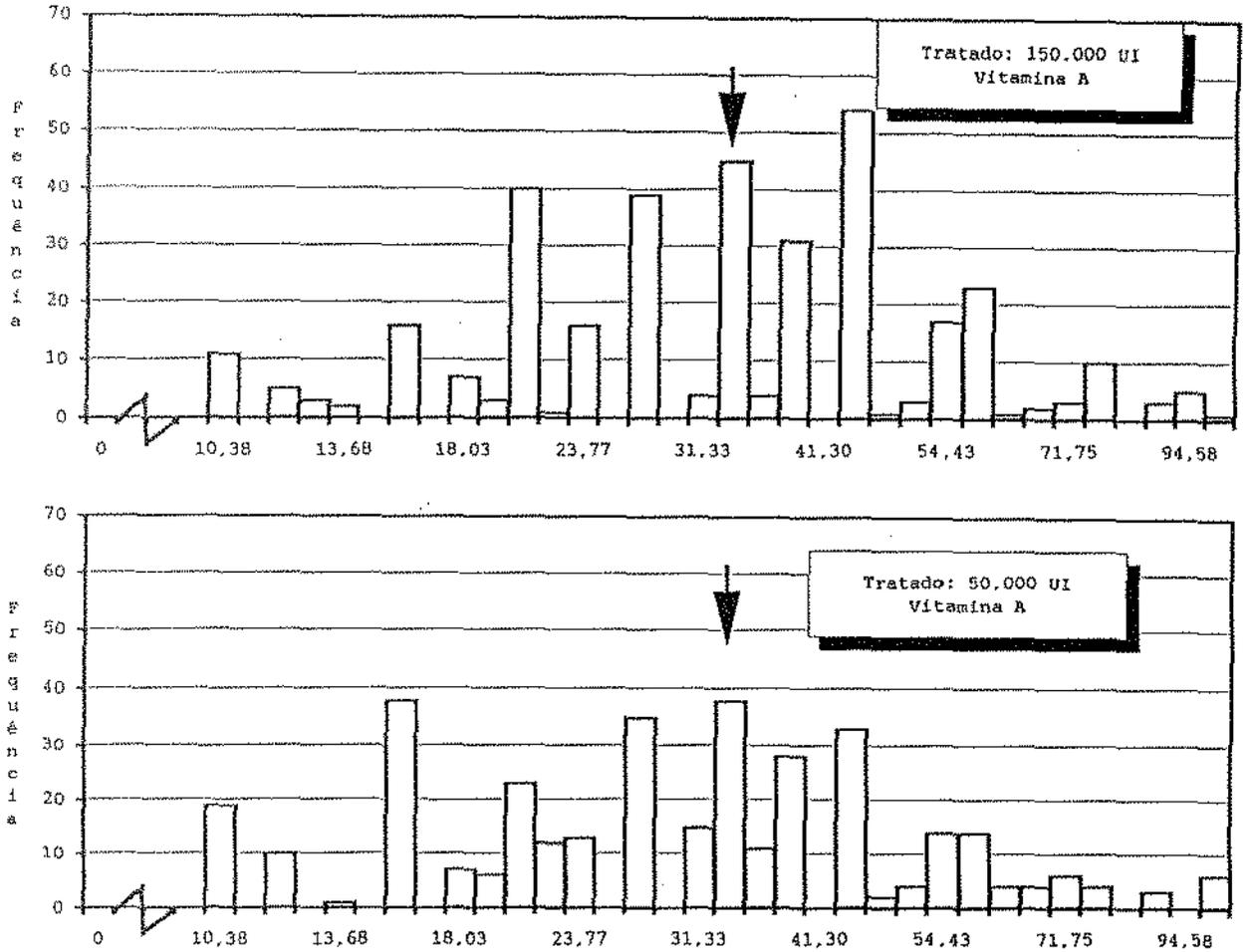


Figura 61 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 70 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	50.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	179	147	326
Maiores ou iguais a mediana	171	203	374
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 5,51737148 *$			

## Rim de feto de rato - Alça de Henle

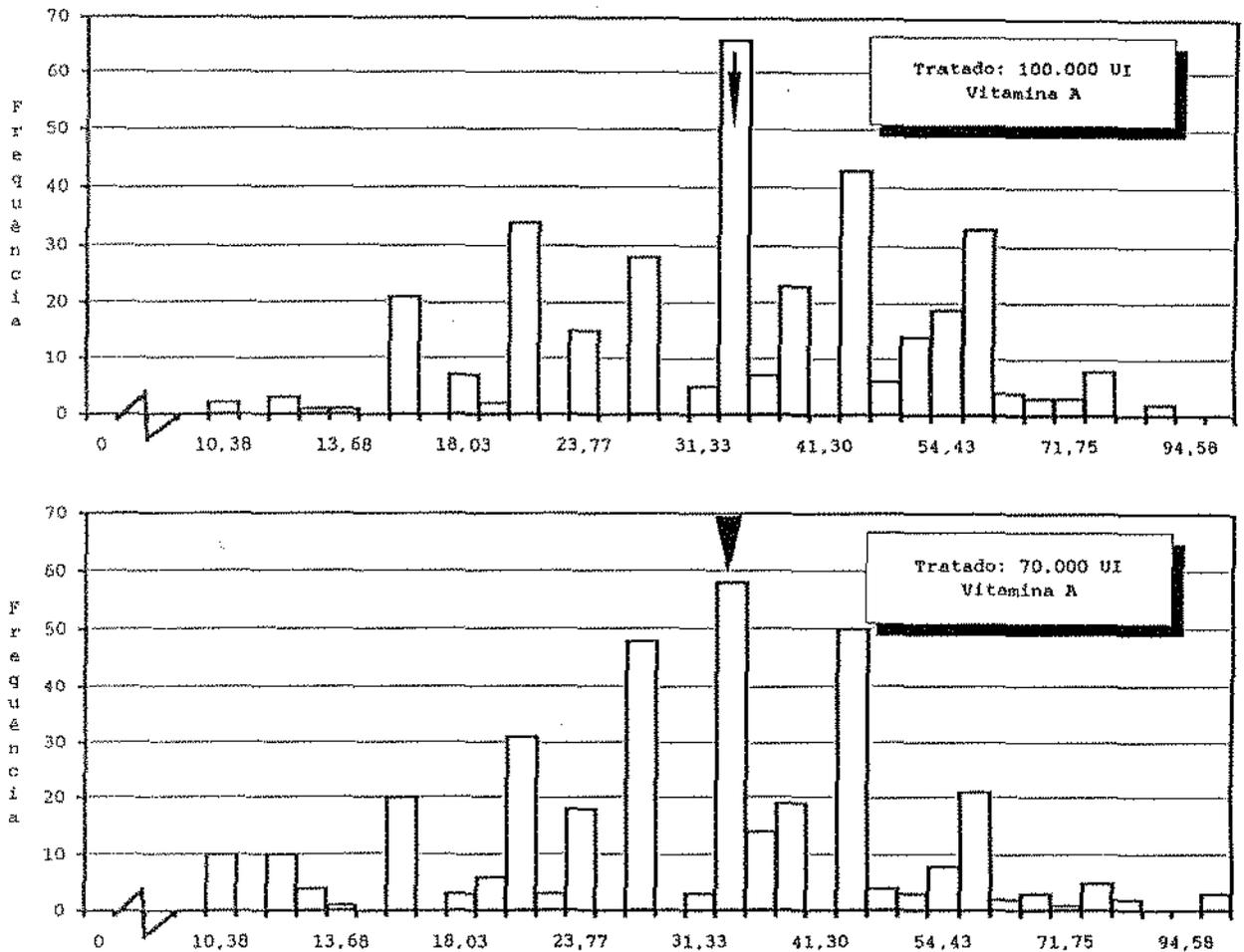


Figura 62 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 71 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	70.000 UI	100.000 UI	Total
Menores que a mediana	179	119	298
Maiores ou iguais a mediana	171	231	402
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 20,340412 *$			

Rim de feto de rato - Alça de Henle

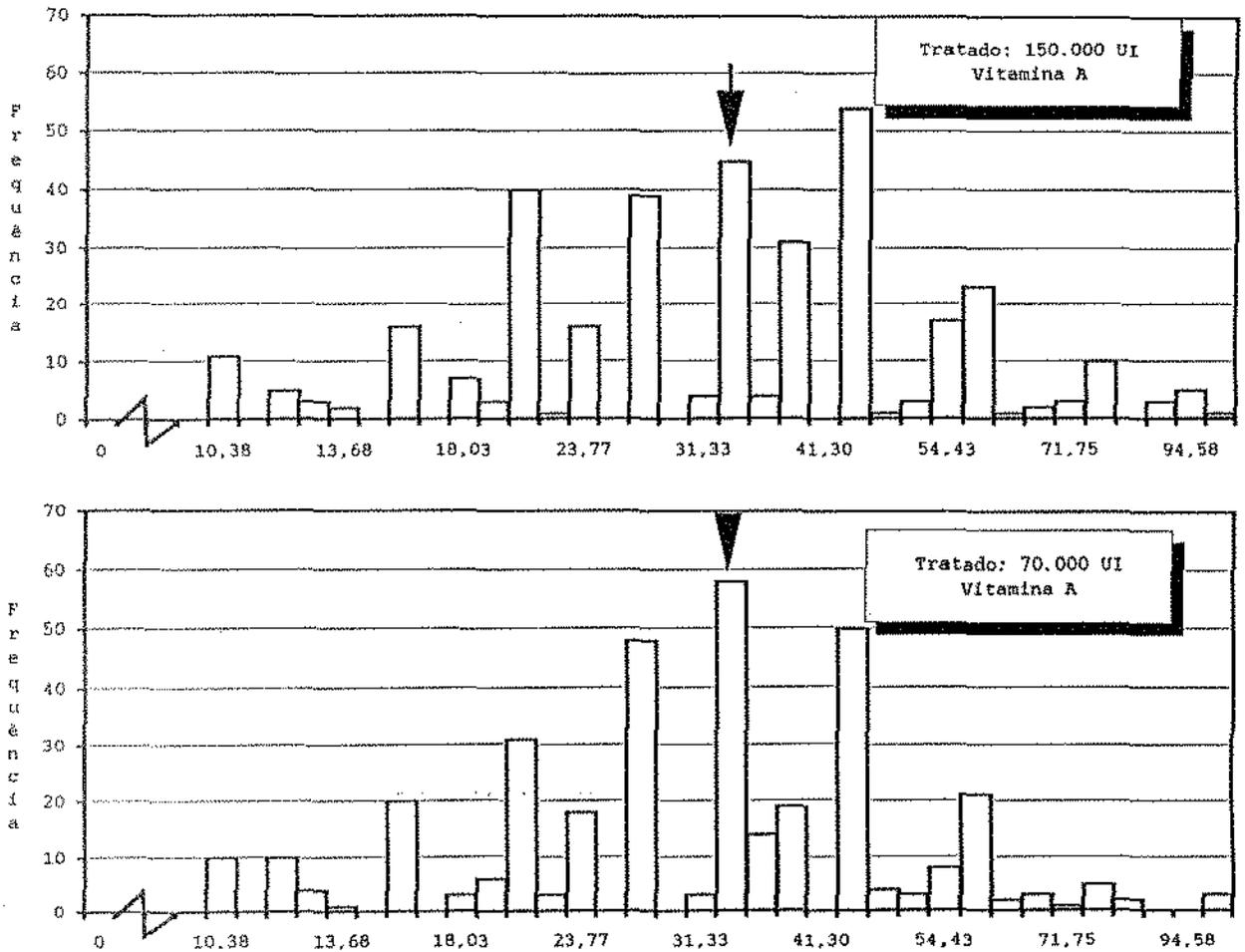


Figura 63 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 72 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	70.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	179	147	326
Maiores ou iguais a mediana	171	203	374
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 5,51737148$			

Rim de feto de rato - Alça de Henle

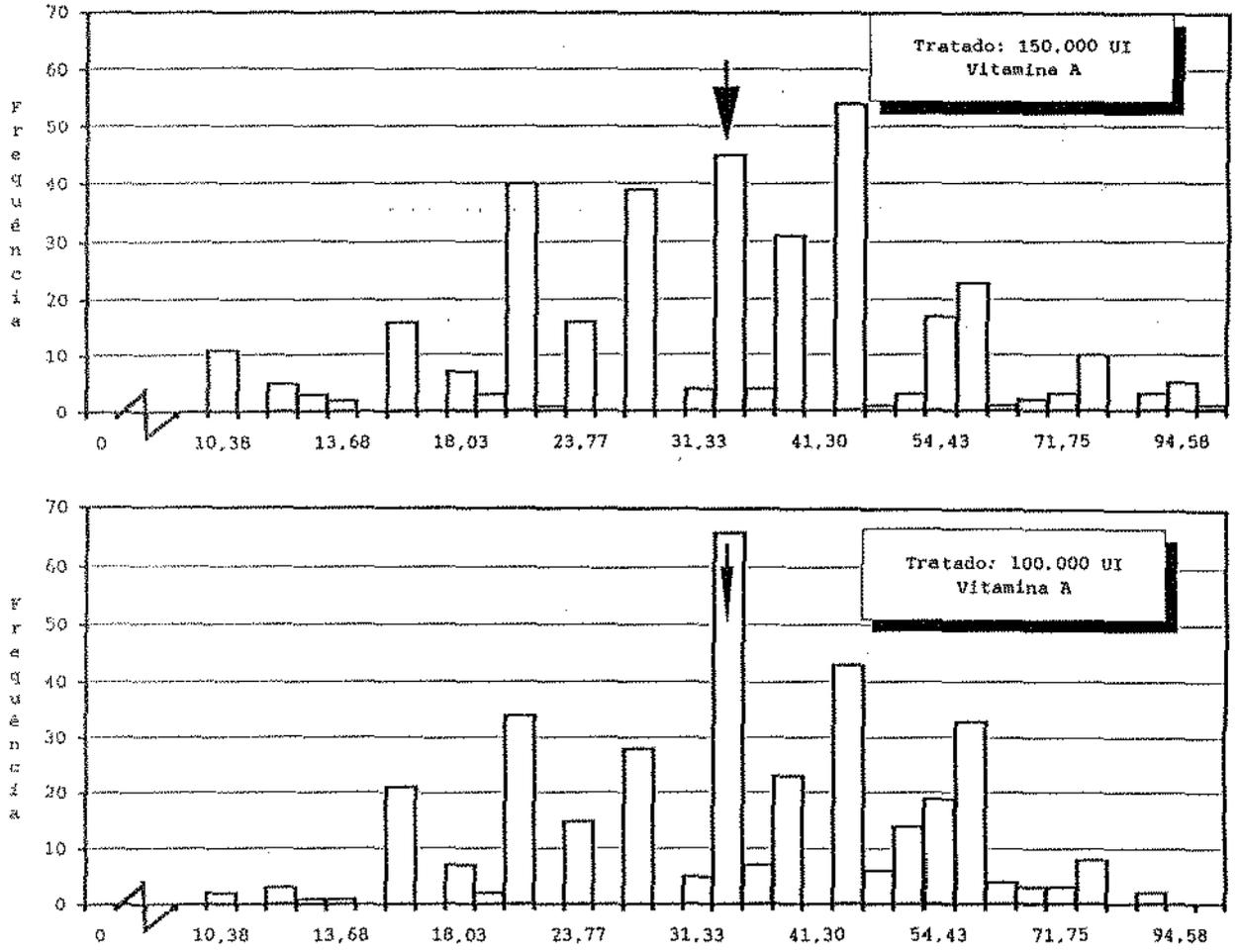


Figura 64 - Histograma da Distribuição de Frequência dos Volumes Nucleares das Amostras Indicadas

Tabela 73 - Teste da Mediana das Amostras Representadas no Histograma Acima

Teste da Mediana: Tabela de Contingência e Probabilidades			
Amostras	100.000 UI	150.000 UI	Total
Menores que a mediana	119	147	266
Maiores ou iguais a mediana	231	203	434
Total	350	350	700
Mediana = 33,57			
$\chi^2 = 5,09944215 *$			

## **4 Discussão**

Durante o período de formação ou embrionário do desenvolvimento é que os diversos teratogênicos podem causar as malformações congênitas.

Considerando o exposto acima, as ratas utilizadas no presente trabalho receberam no 10º dia de prenhez, pela via intraperitoneal, uma dose única de 30.000 UI, 40.000 UI, 50.000 UI, 70.000 UI, 100.000 UI e 150.000 UI de vitamina A e tiveram descendentes malformados.

Por outro lado, estas ratas apresentaram um ganho de peso menor durante a prenhez, quando comparadas com as fêmeas do grupo controle. Tal fato é atribuído ao menor ganho de peso corporal dos fetos, ao pouco desenvolvimento dos anexos embrionários e placentas, e ao número elevado de reabsorções fetais, observados em nosso material (Tabelas 1, 3 e 5). Resultados semelhantes foram obtidos por Contrera (1986), Leme dos Santos (1988) e Costa (1988).

As consequências da administração de uma dose elevada de vitamina A, no 10º dia de prenhez, na rata, observadas ao exame geral, foram: falta de fusão e mesmo ausência dos tubérculos auriculares (anotia), astomia, microstomia e macrostomia, macroglossia com protusão da língua, língua bifida, "*spina bifida*", encurtamento dos membros anterior-

res (focomelia), hidropsia, exoftalmia (uni ou bilateral com aplasia palpebral e, opacificação da córnea) e anencefalia (algumas dessas malformações estão representadas na Figura 1). Essas observações estão de acordo com as já descritas por Cohlán (1953, 1954), Giroud & Martinet (1955, 1956a, b), Giroud e cols. (1958), Deuschle e cols. (1959), Kochhar (1973), Nanda e cols. (1970), Wersing & Swenson (1967) e Contrera (1986) no rato, camundongo, coelho e no cão.

Confirmando os dados de Singh & Singh (1974) e Padmanabhan e cols. (1981), em quase todos os fetos hipervitaminóticos A desta pesquisa ocorreu catarata congênita. Tal fato se deve à ação direta da vitamina A sobre o olho em desenvolvimento.

O peso dos rins, no nosso material, também acompanhou o peso corporal dos animais, pois, apesar do grupo administrado com a dose de 30.000 UI apresentar um ligeiro aumento ponderal (5,86 mg) em relação aos controles (5,10 mg), com aumento da dose observou-se uma hipoplasia renal significativa (5,07 mg - 40.000 UI; 4,89 mg - 50.000 UI; 4,50 mg - 70.000 UI; 3,29 mg - 100.000 UI e 3,41 mg - 150.000 UI).

A análise histológica que precedeu o trabalho morfométrico, revelou uma menor acidofilia citoplasmática das células epiteliais dos túbulos renais estudados e um aumento do volume nuclear nos animais tratados com doses mais altas. Este fato sugere que a vitamina A teria provocado uma modificação na fisiologia destas células epiteliais, que poderia ser explicado por uma alteração na expressão gênica (Wolf, 1991).

Os nossos resultados cariométricos confirmaram os achados histológicos, uma vez que os resultados obtidos com o emprego da técnica da cariometria revelaram que, no túbulo contorcido proximal, a vitamina A provocou um aumento do volume nuclear nos animais tratados com doses mais altas (100.000 UI), apesar de nos animais tratados com 150.000 UI, este aumento de volume não ter sido observado. Um fato que explicaria tal fenômeno poderia ser o de que todos os animais deste grupo eram hidróticos (Figura 1) e a dificuldade de evidenciação dos túbulos proximais nestes animais foi muito grande, inclusive com áreas de degeneração tubular, não possibilitando uma escolha adequada dos núcleos a serem medidos. Quando comparamos doses entre si, também observamos resultados semelhantes. Ao se analisar o túbulo contorcido distal e alças de Henle, observamos um aumento do volume nuclear, inclusive naqueles animais tratados com a dose de 150.000 UI de vitamina A.

Desde a descoberta dos efeitos teratogênicos da hipervitaminose A por Cohlman (1953), os estudiosos tentam descobrir um mecanismo teratogênico que explicasse as malformações observadas nos tecidos moles. Mesmo havendo muita divergência, provavelmente a vitamina A induz defeitos morfogênicos no embrião ou no feto:

1. alterando a migração das células da crista neural cefálica (Nanda e cols., 1970; Morriss, 1976; New, 1978);
2. inibindo a proliferação celular do ectomesênquima (Giroud e cols., 1961; Marin-Padilla, 1966; Myers e cols., 1967; Nanda, 1971; Geelen, 1973; New, 1978);
3. retardando ou inibindo a diferenciação celular (Kalter & Deuschle, 1966; Lewis e cols., 1978; Pennypacker e cols., 1978);
4. induzindo efeitos múltiplos na atividade celular (Walker e Crain, 1960; Kochhar & Johnson, 1965; Lorente & Miller, 1978); ou
5. atuando citotóxicamente, conforme provado pelos estudos ultraestruturais de Morriss (1973) e Theodosis & Fraser (1978).

Em nosso material, o epitélio tubular renal dos fetos tratados com as doses mais elevadas da vitamina, mostrou-se pouco diferenciado e com aspecto de tecido mais embrionário. Sabe-se que a vitamina A tem papel significativo na embriogênese (Ong & Chytil, 1976) e que a sua presença é necessária para garantir a diferenciação celular. Tanto a deficiência quanto o excesso de vitamina A alteram o crescimento e a diferenciação dos diversos órgãos. A hipervitaminose A, então, poderia afinal exercer dois efeitos:

1. retardando o crescimento e alterando a organização tecidual, particularmente o mesênquima urogenital (Marin-Padilla, 1966; Morriss, 1973; Theodosis & Fraser, 1978); poderia haver diminuição do crescimento tanto epitelial (Langman & Welch, 1967) como ectomesenquimal (Marin-Padilla, 1966; Morriss, 1973; Hassell e cols., 1978);
2. atuando na diferenciação celular quer por inibição (Kalter & Warkany, 1961; Kalter & Deuschle, 1966; Lewis e cols., 1978; Pennypacker e cols., 1978; Hassell e cols., 1978) ou por modificação (Wolf & Varandani, 1960; Pelc & Fell, 1960; Langman & Welch, 1966).

Há que se discutir também:

1. a vitamina A atuaria de modo diferente nos experimentos *in vivo* e *in vitro*?
2. órgãos, tecidos ou tipos celulares apresentariam respostas específicas a diferentes doses da vitamina?
3. as respostas poderiam ser de estimulação, inibição ou nenhuma delas, dependendo do fenótipo?

Sabe-se que a vitamina A impede o desenvolvimento (Morriss & Steele, 1974) e reduz o crescimento tanto *in vivo* (Giroud & Martinet, 1956b, Marin-Padilla, 1966; Langman & Welch, 1967; Nanda, 1971) como *in vitro* (Myers e cols., 1967; Hassell e cols., 1978; Shapiro & Poon, 1979). Nas células epitelial e mesenquimal, a atuação da vitamina A na diferenciação é comparável *in vivo* (Kalter, 1960; Kalter & Deuschle, 1966) e *in vitro* (Pennypacker e cols., 1978; Lewis e cols., 1978).

No que se refere às respostas dos diferentes órgãos e tecidos frente à hipervitaminose A, sabe-se que a vitamina atua de modo similar no crescimento da camada germinativa primordial (Morriss, 1972), no mesênquima cefálico (Langman & Welch, 1967), no mesênquima urogenital (Marin-Padilla, 1966), nos processos palatinos (Giroud e cols., 1956; 1961; Myers e cols., 1967) e no mesênquima dos membros (Hassell e cols., 1978). Desse modo, diferentes tecidos provavelmente respondem da mesma maneira às diferentes doses excessivas de vitamina A.

Um ponto importante a ser considerado é que a vitamina A influencia o genoma. Células epiteliais e mesenquimais estão presentes no processo urogenital e participam do seu desenvolvimento diferenciado, movimentação morfogênética e penetração ectomesenquimal normais. A vitamina A poderia ocasionar modificações genéticas no animal, como sugerido por Yuspa & Harris (1974), modificando a diferenciação das células epiteliais (Fell, 1962; Wong & Buck, 1971). A ação da vitamina na organização biológica ao nível genético das células epiteliais foi sugerida, também, por Chytil & Ong (1979) e por Takase e cols. (1979).

Sabe-se que a vitamina A é mobilizada dos estoques do fígado e é levada aos tecidos periféricos, por meio de transporte altamente regulado. Este sistema envolve duas proteínas plasmáticas: a proteína ligada ao retinol (RBP) e a pré-albumina. No plasma, a vitamina A normalmente circula na forma de retinol, especialmente ligada à RBP

(Takahashi e cols., 1974 e 1977). A RBP, por outro lado, forma um complexo proteína-proteína com a pré-albumina. Estas proteínas, então, servem para transportar a vitamina A do fígado até as membranas. Quando as reservas hepáticas da vitamina, e o sistema transportador da RBP se tornam saturados em consequência da ingestão excessiva de retinol, ou da presença de lesão hepática, até 65% dos retinóides plasmáticos podem estar presentes sob a forma de ésteres de retinil associados às lipoproteínas. De forma semelhante, após administração aguda de álcool ocorre acúmulo de ésteres de retinil (Grummer, 1990). Como o retinol é biologicamente inerte quando ligado à RBP, esses ésteres de retinil, que são surfactantes podem ser responsáveis por grande parte da toxicidade observada (Mallia e cols., 1975; Smith e Goodman, 1976).

Por outro lado, o retinol ligado à RBP, quando alcança a membrana celular se liga em sítios específicos sobre a superfície celular (Sivaprasadarao e Findlay, 1988a, b). O retinol é transferido para uma proteína ligada à membrana que parece estar estritamente relacionada à proteína celular ligadora de retinol (CRBP). Esta transporta o retinol até o núcleo, onde afetaria diretamente a expressão gênica por modificar a biossíntese de RNAm (Blaner, 1989; Wolf, 1991), alterando sua concentração nuclear.

A ação direta da vitamina A em órgãos fetais recebeu apoio no trabalho de Lorente & Miller (1977), já que se pode encontrar metabólitos do retinol e do ácido retinóico no feto; sendo, então, mais provável uma ação direta da vitamina do que por alterações placentárias.

Vários são os experimentos que indicam essa possibilidade de ação direta da vitamina A no embrião (Cohlan, 1954; Morriss, 1973). Na fase trilaminar do desenvolvimento, o ectoderma e o mesoderma respondem mais ao excesso de vitamina A (Morriss, 1972 e 1976); o endoderma responde menos. Durante a organogênese, a vitamina A provoca uma parada no ectomesênquima (Morriss, 1973), ou altera significativamente as propriedades celulares (Marin-Padilla, 1966). Durante este mesmo período são visíveis lesões epiteliais difusas sem lesões aparentes no mesênquima (Theodosis & Fraser, 1978). Subsequentemente, os derivados mesenquimatosos dos processos embrionários em formação estão hiperdesenvolvidos (Abramovich & Devoto, 1967; Steffek e cols., 1967). Há falha na diferenciação dos tecidos muscular e glandular (Kalter, 1960). Somada à ação no osso, cartilagem e órgãos dentais, o excesso de vitamina A também induz drasticamente mais

deficiências que excessos no crescimento em geral. Exemplos de crescimento excessivo são massas teciduais encontradas na língua por Walker & Crain (1960), os polipos mucosos (Deuschle, Geiger & Warkany, 1959) e as dobras epiteliais (Kochhar & Johnson, 1965). Os excessos teciduais aparecem na pele, osso, cartilagem e dentes (Kalter, 1960).

O trabalho de Takekoshi (1964), associado à administração de vitamina A com outras substâncias, evidenciou que a atividade teratogênica era acentuada pela cortisona e pelo metil-tiouracil, e que havia um papel protetor desempenhado pelas vitaminas do complexo B, pela insulina e, mais efetivamente, pela tiroxina. Este autor postulou que o mecanismo teratogênico implicava em interferência com o metabolismo dos carboidratos da mãe, placenta ou feto. Esse autor afirmou, ainda, ser a queda dos níveis sanguíneos de tiroxina, devida ao excesso de vitamina A administrada, um fator importante no mecanismo teratogênico e a razão para o efeito potencializante do metil-tiouracil.

As alterações da permeabilidade das membranas, sugeridas após trabalhos "*in vitro*" (vide revisão de Dingle & Lucy, 1965), foram confirmadas nos trabalhos de ultra-estrutura utilizando fibroblastos da derme do rato (Dingle & Lucy, 1965; Daniel e cols., 1966), pele de embrião de galinha (Jackson & Fell, 1963) e eritrócitos (Glauert e cols., 1963). Os efeitos foram particularmente nas membranas, causando irregularidades na membrana plasmática dos fibroblastos, aumento de volume das mitocôndrias, vacuolização das membranas dos eritrócitos e o aumento de fluido nas células epidérmicas e nos eritrócitos, sugerindo, então, alteração na permeabilidade da membrana. A vitamina A também causa um aumento da área de superfície com a formação de uma "membrana artificial" (uma camada de lecitina/colesterol) idealizada por Bangham e cols. (1964). Em 1962, Dingle & Lucy já haviam proposto que a membrana seria o local de atuação fisiológica da vitamina.

Para Marin-Padilla & Ferm (1965) e Marin-Padilla (1966) a permeabilidade alterada das membranas, ocasionadas pela administração de vitamina A em excesso, causaria alterações no mesoderma, o que levaria à formação de somitos anormais e, mais tarde, à necrose dos mesmos. Tais fatos causariam o desenvolvimento anormal do sistema nervoso central. Mais tarde, Morriss (1972), estudando as alterações celulares precoces do embrião de rato, ao nível de microscopia eletrônica, confirmou os resultados de Marin-Padilla (1966) e comparou-os àqueles descritos em várias situações "*in vitro*" de hipervitaminose A

(Jackson & Fell, 1963).

Sabe-se que a vitamina A administrada em excesso inibe a formação de novos vasos sanguíneos (Nelken e cols., 1965), como também que a penetração da vitamina A na membrana seguida da formação de vacúolos parece ter efeito nos mecanismos de captação e liberação de oxigênio e que tal efeito, dependendo da sua intensidade de duração, poderia causar um estado temporário de hipoxia (Morriss, 1973). Ingalls e cols. (1950) obtiveram malformações quando submeteram camundongas grávidas à baixa pressão. Daí ser possível que a hipoxidose maternal suplementasse a ação teratogênica direta da hipervitaminose A.

O mecanismo de ação da vitamina A na produção de numerosas lesões, resultantes da administração de doses excessivas, é muito mais complexo; e Strebel e cols. (1969) já apontavam para o fato da vitamina A, sob forma de palmitato, administrada intraperitonealmente, atuar diretamente nos órgãos. Essas lesões seriam a consequência de: alterações nas membranas celulares, nas organelas e nas suas estruturas físico-químicas, destruição considerável de substância basal, atividade enzimática alterada, modificações na síntese dos lipídeos e glicosaminoglicanas (mucopolissacarídeos), modificação no metabolismo intermediário, metaplasia, etc. Os fatores endócrinos têm de ser levados em conta, especialmente nos estudos *in vivo*, uma vez que desempenham um importante papel no problema de hipervitaminose A e, em particular, nas malformações.

A soma considerável de elementos e evidências sobre a atuação de doses excessivas de vitamina A em diferentes tecidos permitem admitir que um ou mais desses mecanismos possam explicar os dados do presente trabalho.

Embora para Lorente & Miller (1977) a ação direta da vitamina A nos tecidos embrionários seja mais importante que os efeitos das alterações placentárias, não podemos esquecer que existe uma relação direta entre tamanho fetal e tamanho da placenta. Em nosso material as placentas daqueles fetos que receberam as diversas doses altas apresentaram-se diminuídas, o que poderia contribuir para o desenvolvimento fetal retardado por nós observado (Tabela 3).

Foi sugerido que o comprimento do cordão umbilical seria um indicador confiável do movimento fetal. O comprimento do cordão umbilical é influenciado por, pelo menos, dois fatores: a incidência do movimento fetal e o espaço intrauterino disponível

(Miller e cols., 1981; Moessinger e cols., 1982; Moessinger, 1983). Se houver diminuição do espaço intra-uterino ou se o movimento fetal for bloqueado, haverá uma diminuição no estiramento do cordão umbilical e o comprimento do mesmo diminuirá. Por exemplo, cordões umbilicais encurtados foram observados em humanos com defeitos estruturais ou funcionais dos membros, que limitaram o movimento fetal (Miller, 1981). Injetando curare em roedores, durante a prenhez, com a finalidade de aumentar a pressão no saco amniótico e suprimir os movimentos fetais, Moessinger e cols. (1982) e Moessinger (1983) observaram cordões umbilicais mais curtos. Expondo ratas prenhes à ação do álcool, Barron e cols. (1986) observaram movimentos fetais suprimidos e cordões umbilicais mais curtos.

Em nosso material, a hipervitaminose está associada ao encurtamento dos cordões umbilicais, principalmente nos fetos que receberam doses acima de 50.000 UI da vitamina, em relação aos controles (Tabela 5). Tal fato não é devido somente a uma função das diferenças do peso corporal, mas é indicativo de que o movimento fetal pode estar diminuído como consequência da hipervitaminose A materna.

Os dados obtidos neste trabalho, nos fetos tratados, sugerem que a vitamina A, administrada numa única dose de 30.000 UI, 40.000 UI, 50.000 UI, 70.000 UI, 100.000 UI ou 150.000 UI, pela via intraperitoneal, durante o período teratogênico, causa: malformações variadas craniofaciais, dos membros, dos órgãos, como defeitos renais, traduzidos por alterações de densidade tintorial citoplasmática das células epiteliais tubulares e do volume nuclear. Verificou-se, ainda, que o emprego de diferentes doses progressivas de vitamina A significou encontrar alterações microscópicas diferenciadas e cada vez mais graves. Essas doses diferentes e crescentes aumentam, também, a intensidade das malformações anatómicas, sendo que as doses mais altas diversificaram ainda mais os tipos de malformações.

Não se sabe se a ação da vitamina A é imediata ou se é uma resposta secundária. Também não se sabe se o crescimento tecidual foi estimulado imediatamente após a administração de uma única dose de vitamina A empregada neste estudo, ou se esse crescimento foi temporariamente inibido como uma resposta ao nível mitótico aumentado. De acordo com Morriss (1973), a ação teratogênica da vitamina é rapidamente detectada, algumas horas após a sua administração. Para Kochhar & Aydelotte (1974) e Nakamura e cols. (1974) essa ação somente é detectada 24 horas após a administração da vitamina A.

## **5 Conclusão**

Com base nas evidências experimentais, conclui-se que:  
a vitamina A, quando administrada às ratas-mães num período crítico da gestação, nas doses de 30.000 UI, 40.000 UI, 50.000 UI, 70.000 UI, 100.000 UI ou 150.000 UI:

1. induziu malformações nos neonatos;
2. provocou uma diminuição ponderal nos fetos, cujo peso decresceu à medida que se aumentaram as doses do fármaco;
3. provocou uma diminuição no peso das placentas e no comprimento dos cordões umbilicais à medida que se aumentaram as doses do fármaco;
4. promoveu uma diminuição no peso dos rins dos fetos, que foi mais evidente quando empregou-se doses mais elevadas;
5. promoveu um aumento do volume nos núcleos das células dos túbulos contorcidos - proximal, distal e alça de Henle - dos rins dos fetos. O volume nuclear aumentou mantendo uma relação dose/efeito com a vitamina administrada, provavelmente devido ao incremento do metabolismo renal.

## 6 **Resumo**

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar morfológica e morfométricamente as alterações de volumes nucleares no epitélio dos túbulos contorcidos e alças de Henle, causadas pela hipervitaminose A em rins de fetos de ratas tratadas com diferentes doses de vitamina A.

Para tanto, foram utilizados 42 fetos de ratas que, no décimo dia de prenhez receberam, intraperitonealmente, 30.000 UI, 40.000 UI, 50.000 UI, 70.000 UI, 100.000 UI ou 150.000 UI de vitamina A, sob a forma de palmitato de retinil em solução coloidal hidromiscível; e 7 fetos de ratas que receberam solução salina.

Os rins dos fetos, colhidos no 21<sup>o</sup> dia de prenhez das ratas, foram fixados em solução de Alfac, por 24 horas, pesados e incluídos em parafina. Após a microtomia semiseriada dos rins esquerdos, a uma espessura de 7  $\mu$ m, os cortes histológicos foram corados pela hematoxilina-cosina, para as mensurações ao microscópio.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

1. a vitamina A atua na embriogênese causando modificações no desenvolvimento com nascimento de fetos de menor peso e malformações, bem como menor peso renal.

2. a vitamina A provoca um aumento do volume nuclear dos epitélios dos túbulos renais estudados, nos animais tratados com doses mais elevadas.
3. o emprego de doses progressivas de vitamina A mostra também alterações microscópicas no tecido renal, diferenciadas e cada vez mais graves.

## 7 Summary

The present paper had the purpose of characterizing, morphological and morphometrically, the changes in nuclear volumes in the epithelia of the convoluted tubules and Henle's loops caused by hypervitaminosis A on the kidneys of rat fetuses treated with different doses of vitamin A.

Forty-two rat fetuses were used, of which their mothers received 30.000 UI, 40.000 UI, 50.000 UI, 70.000 UI, 100.000 UI or 150.000 UI of vitamin A, intraperitoneally, on the tenth day of pregnancy, under the form of retinyl palmitate in hydromiscible solution, while seven pregnant rats received saline solution. The fetuses kidneys collected on the 21st day of the rats' pregnancy, were fixed during 24 hours in Alfac solution, weighed and embedded in paraffin. After semiserial microtomy of the left kidneys (7 m thick), the histological sections were stained by hematoxylin-eosin for microscopic measurements.

The results lead us to conclude that:

1. vitamin A acts on embryonic development causing changes such as the birth of lighter and malformed fetuses, as well as a smaller kidney weights.
2. vitamin A induces an increase of the nuclear volume in the epithelia of the renal tubules in the animals treated with higher doses.

3. the use increasingly doses of vitamin A also show's microscopic and differentiated alterations correspondingly more severe.

## **8 Referências Bibliográficas**

- ABRAMOVICH, A. & DEVOTO, F.C.H. Condrogenesis maxillo-facial equitopica en fetos de ratas tratadas con altas dosis de vitamina A. Rev. Assoc. Odontol. Argentina, 55: 237-242, 1967.
- ADAMS, C. E.; HAY, M. F.; LUTEWAKMANN, C. The action of various agents upon the rabbit embryo. J. Embryol. Exp. Morphol., 9: 468-491, 1961.
- AUSTIN, C.R. Embryo transfer and sensitivity to teratogenesis. Nature, 244: 333-334, 1973.
- BANGHAM, A.D.; DINGLE, J.T.; LUCY, J.A. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 9. Penetration of lipid monolayers by compounds in the vitamin A series. Biochem. J., 90: 133-140, 1964.
- BARRON, S.; RILEY, E.P. & SMOTHERMAN, W.P. The effect of prenatal alcohol exposure on umbilical cord length in fetal rats. Alc. Clin. Exp. Res., 10: 493-495, 1986.

- BENDICH, A. & LANGSETH, L. Safety of vitamin A. *Am. J. Clin. Nutr.*, **49**: 358-371, 1989.
- BERNHARDT, I.B. & DORSEY, D.J. Hypervitaminosis A and congenital renal anomalies in a human infant. *Obstet. Gynecol.*, **43**: 750-755, 1974.
- BIESALSKI, H.K. Comparative assessment of the toxicology of vitamin A and retinoids in man. *Toxicology*, **57**: 117-161, 1989.
- BLANER, W.S. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr. Rev.*, **10** (3): 308-316, 1989.
- CHEVALIER, A.; CORNIL, L.; CHABRE, P. Sur l'influence de doses massives de vitamin A chez des animaux soumis a un régime normal. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **115**: 541-543, 1934.
- CHYTIL, F. & ONG, D.E. Cellular retinol and retinoic acid binding proteins in vitamin A action. *Fed. Proc.*, **38**: 2510-2514, 1979.
- COHLAN, S.Q. Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science*, **117**: 535-536, 1953.
- COHLAN, S.Q. Congenital anomalies in the rat produced by the excessive intake of vitamin A during pregnancy. *Pediatrics*, **13**: 556-557, 1954.
- CONTRERA, M.G.D. Estudo morfológico, morfométrico e radiológico das malformações provocadas pela hipervitaminose A no feto do rato. Tese de Livre Docência, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP, Ribeirão Preto, 1986.
- COSTA, J.R.V. Hipervitaminose A em fetos de ratos. I. Estudo morfológico, morfométrico e estereológico das alterações presentes no epitélio da mucosa palatina. II. Estudo da

Relação Dose/Efeito. Tese. Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, 1988.

DANIEL, M.R.; DINGLE, J.T.; GLAUERT, A.M. & LUCY, J.A. The action of excess vitamin A alcohol on the fine structure of rat dermal fibroblasts. J. Cell. Biol., 30: 465-475, 1966.

DAVIES, A.W. & MOORE, T. Vitamin A and carotene. XI. The distribution of vitamin A in the organs of the normal and hypervitaminotic rat. Biochem. J., 28: 288-295, 1934.

DEUSCHLE, F.M.; GEIGER, J.F. & WARKANY, J. Analysis of an anomalous ocular dental facial pattern in newborn rats produced by maternal hypervitaminosis A. J. Dental Res., 38: 149-155, 1959.

DINGLE, J.T. & LUCY, J.A. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. V. The effect of vitamin A on the stability of the erythrocyte membrane. Biochem. J., 98: 173, 1962.

DINGLE, J.T. & LUCY, J.A. Membrane phenomenon in relation to vitamin A. Proc. Nutr. Soc., 24: 170-172, 1965.

FANTEL, A.G.; SHEPARD, T.M.; NEWELL-MORRIS, L.L. & MOFFET, B.C. Teratogenic effects of retinoic acid in pigtail monkeys (*Macaca nemestrina*). I. General features. Teratology, 15: 85-91, 1977.

FELL, H.B.; DINGLE, J.T. & WEBB, M. The specificity on the effect on embryonic chick-limb cartilage in culture and on isolated rat liver lysosomes. Biochem. J., 83: 63-69, 1962.

FERNHOFF, P.M. & LAMMER, E.J. Craniofacial features of acrofacial dysostosis. J. Pediatr., 105: 595-597, 1984.

- GEELEN, J.A.G. Vitamin A induced anomalies in young rat embryos. *Acta. Morphol. Neerl. Scand.*, 11: 233-240, 1973.
- GEELEN, J.A.G. Hypervitaminosis A induced teratogenesis. *C. R. C. Crit. Rev. Toxicol.*, 6: 351-375, 1979.
- GERLACH, T.H. & ZILE, M.H. Upregulation of serum retinol in experimental acute renal failure. *FASEB J.*, 4: 2511-2517, 1990.
- GIROUD, A. Période tératogène et son importance. In: *Congress de l'Union Therapeutique Internationale*, 8<sup>e</sup>, Bruxelles, 15-21, 1963.
- GIROUD, A.; GOUNELLE, H. & MARTINET, M. Concentration de la vitamine A chez la mère et le foetus au cours de la tératogenèse par hypervitaminose A. *C.R. Soc. Biol. Vol. CL*, 12: 2064, 1956.
- GIROUD, A. & MARTINET, M. Malformations embryonnaires par hypervitaminose A. *Arch. Fr. Pediatr.*, 12: 292-300, 1955.
- GIROUD, A. & MARTINET, M. Hypovitaminose A et hypervitaminose A chez le jeune et chez l'embryon. *Centre Int. l'Enfance*, 2: 55-68, 1956a.
- GIROUD, A. & MARTINET, M. Tératogénèse par hautes doses de vitamine A en fonction des stades du développement. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, 45: 77-98, 1956b.
- GIROUD, A. & MARTINET, M. Malformations oculaires avec fibrose du vitré chez embryons de lapin soumis à l'hypervitaminose A. *Soc. Ophth. de France*, 3: 1-11, 1959.
- GIROUD, A. MARTINET, M. & HEITZ, F. Stades de productions de la fissure palatine chez la souris. *Bull. Assoc. Anat. XLVIIème Réunion*, Naples, 343-345, 1961.

- GIROUD, A.; MARTINET, M. & ROUX, C. Urétéro - hydronephrose expérimentale chez l'embryon par hypervitaminose A. Arch. Franc. Pédiat., 15: 540-552, 1958.
- GLAUERT, A.M.; DANIEL, M.R.; LUCY, J.A. & DINGLE, J.T. Changes in the fine structure of erythrocyte during haemolysis by vitamin A. J. Cell. Biol., 17: 111-121, 1963.
- GOODMAN, D.S. Vitamin A metabolism. Federation Proc., 39: 2716-2722, 1980.
- GORODISCHER, R. Micronutrients and drug response: vitamin A and vitamin E in the fetus and in the newborn. Dev. Pharmacol. Ther., 15: 166-172, 1990.
- GRUMMER, M.A. & ZACHMAN, R.D. The effect of maternal ethanol ingestion on fetal vitamin A in the rat. Pediatr. Res., 28: 186-189, 1990.
- HALE, F. The relation of vitamin A to anophthalmos in pigs. Amer. J. Ophthalm., 18: 1087, 1935.
- HALL, J.G. Vitamin A: a newly recognized human teratogen. Harbinger of things to come? J. Pediatr., 105: 583-584, 1984.
- HASSELL, J.R.; PENNYPACKER, J.P. & LEWIS, C.A. Chondrogenesis and cell proliferation in limb bud cell cultures treated with cytosine arabinoside and vitamin A. Exp. Cell. Res., 112: 409-417, 1978.
- HATHCOCK, J.N.; HATTAN, D.G.; JENKINS, M.Y.; McDONALD, J.T.; SUNDARESAN, P.R. & WILKENING, V. Evaluation of vitamin A toxicity. Am. J. Clin. Nutr., 52: 183-202, 1990.
- HENDRICKX, A.G.; SILVERMAN, S.; PELLEGRINI, M. & STEFFEK, A.J. Teratological and radiocephakometric analysis of craniofacial malformations induced with retinoic acid in Rhesus Monkeys (*Macaca mullata*). Teratology, 22: 13-22, 1980.

- HOPKINS, S.G. Feeding experiments illustrating the importance of accessory factors in the normal dietaries. *J. Physiol.*, **44**: 425-460, 1912.
- HOWARD, W.B.; WILLHITE, C.C.; SHARMA, R.P. Structure-toxicity relationships of the tetramethylated tetralin and inclane analogs of retinoic acid. *Teratology*, **36**: 303-311, 1987.
- INGALLS, T.H.; CURLEY, F.J. & PRINDLE, R.A. Anoxia as a cause of fetal death and congenital defect in the mouse. *Am. J. Dis. Child.*, **80**: 34-45, 1950.
- JACKSON, S.F. & FELL, H.B. Epidermal fine structure in embryonic chicken skin during atypical differentiation induced by vitamin A in culture. *Dev. Biol.*, **7**: 394-419, 1963.
- KALTER, H. The teratogenic effects of hypervitaminosis A upon the face and mouth of inbred mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **85**: 42-55, 1960.
- KALTER, H. & DEUSCHLE, M.F. Congenital malformations experimentally induced by hypervitaminosis A. OHIO, American Association for the Advancement of Science, 273-292, 1966.
- KALTER, H.G. & WARKANY, J., Congenital malformation of the rectum and uro-genital system induced by maternal hypervitaminosis A in strains of inbred mice. *Anat. Rec.*, **136**: 219, 1960.
- KALTER, H.G. & WARKANY, T. Experimental production of congenital malformations in strains of inbred mice by maternal treatment with hypervitaminosis A. *Amer. J. Pathol.*, **38**: 1-22, 1961.
- KOCHHAR, D.M. Teratogenic activity of retinoic acid. *Acta. Pathol. Microb. Scand.*, **70**: 398-404, 1967.

- KOCHHAR, D.M. Limb development in mouse embryos. I. Analysis of teratogenic effects of retinoic acid. *Teratology*, **7**: 289-298, 1973.
- KOCHHAR, D.M. & AYDELOTTE, M.B. Susceptible stages and abnormal morphogenesis in the developing mouse limb, analysed in organ culture after transplacental exposure to vitamin A (retinoic acid). *J. Embryol. Morphol.*, **31**: 721-734, 1974.
- KOCHHAR, D.M. & JOHNSON, E.M. Morphological and autoradiographic studies of cleft palate induced in rat embryos by maternal hypervitaminosis A. *Am. J. Embryo. Exptl. Morph.*, **14**: 223-238, 1965.
- KOCHHAR, D.M.; PENNER, J.D. & TELLONE, C.I. Comparative teratogenic activities of two retinoids. Effects on palate and limb development. *Terat. Carcin Mutagen.*, **4**: 377-387, 1984.
- LAMMER, E.J.; CHEN, D.T.; HOAR, R.M.; AGNISH, N.D.; BENKE, P.J.; BRAUN, J.T.; CURRY, C.J.; FERNHOFF, P.M.; GRIX, A.W.; LOTT, I.T.; RICHARD, J.M. & SUN, S.C. Retinoid acid embryopathy. *N. Engl. J. Med.*, **313**: 837-841, 1985.
- LANGMAN, J. & WELCH, G.W. Effect of vitamin A on development of the central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, **128**: 1-6, 1966.
- LANGMAN, J. & WELCH, G.W. Excess vitamin A and development of the cerebral cortex. *J. comp. Neurol.*, **131**: 15-26, 1967.
- LEME DOS SANTOS, H.S. *Hipervitaminose A em fetos de ratos. I. Estudo morfológico, morfométrico e estercológico das alterações presentes no epitélio lingual. II. Estudo morfológico das alterações ósseas, empregando-se o vermelho de Alizarina S. Tese. UNESP, Jaboticabal, 1988.*

- LEWIS, C.A.; PRATT, R.M.; PENNYPACKER, J.P. & HASSEL, J.R. Inhibition of limb chondrogenesis in vitro by vitamin A. Alterations in cell surface characteristics. Dev. Biol., 64: 31-47, 1978.
- LEWIS, J.T. & RETI, L. Sobre el problema de la hipervitaminosis A y la inocuidad de las grandes dosis de provitamin A (carotene cristalizado). Rev. Soc. Arg. Biol., 10: 302-312, 1934.
- LOPES, R.A. Efeitos da hipervitaminose A sobre o testículo e o rim de rato, durante a lactação: Estudo alométrico e histopatológico. Tese. Ribeirão Preto, 1973.
- LORENTE, C.A. & MILLER, S.A. Fetal and maternal vitamin A levels in tissues of hypervitaminotic A rats and rabbits. J. Nutr., 107: 1816-1821, 1977.
- LORENTE, C.A. & MILLER, S.A. Vitamin A induction of cleft palate. Cleft. Palate J., 15(4): 378-385, 1978.
- LOTT, I.T.; BOCIAN, M.; PRIBRAM, H.W. & LEITNER, M. Fetal hydrocephalus and ear anomalies associated with maternal use of isotretinoin. J. Pediatr., 105: 597-600, 1984.
- MALLIA, A.K.; SMITH, J.E. & GOODMAN, D.S. Metabolism of retinol binding protein and vitamin A during hypervitaminoses A in the rat. J. Lipid. Res., 16: 180-188, 1975.
- MARIN-PADILLA, M. Mesodermal alterations induced by hypervitaminosis A. J. Embryol. Exp. Morphol., 15: 261-269, 1966.
- MARIN-PADILLA, M. & FERM, V.H. Somite necrosis and developmental malformations induced by vitamin A in the golden hamster. J. Embryol. Exper. Morphol., 13: 1-8, 1965.
- MARKS, J. The fat soluble vitamins in modern medicine. In: Harris, R.S.; Munson, P.I.;

- Dizfaluzy, G. & Glover, J. Vitamins and Hormones. New York, Academic Press, v.32, pp 131-154, 1974.
- McCOLLUM, E.V. & DAVIS, M. The necessity of certain lipids in the diet during growth. J. Biol. Chem., 15: 167-175, 1913.
- MILLER, M.E.; HIGGINBOTTOM, M.C. & SMITH, D.W. Short umbilical cord: Its origin and relevance. Pediatrics, 67: 618-621, 1981.
- MOESSINGER, A.C. Fetal akinesia deformation sequence: An animal model. Pediatrics, 72: 857-863, 1983.
- MOESSINGER, A.C.; BLANCH, W.A.; MARONE, P.A. & POLSEN, D.C. Umbilical cord length as an index of fetal activity: Experimental study and clinical implications. Pediatr. Res., 16: 109-112, 1982.
- MORRISS, G.M. Morphogenesis of the malformations induced in rat embryos by maternal hypervitaminosis A. J. Anat., 113: 241-250, 1972.
- MORRISS, G.M. The ultrastructural effects of excess maternal vitamin A on the primitive streak stage rat embryo. J. Embryol. Exp. Morphol., 30: 219-242, 1973.
- MORRISS, G.M. Vitamin A and congenital malformations. Int. J. Vitamin Nutr. Res., 46: 220-222, 1976.
- MORRISS, G.M. & STEELE, C.E. The effect of excess vitamin A on the development of rat embryos in culture. J. Embryol. Exp. Morphol., 32: 505-514, 1974.
- MYERS, G.S.; PETRAKIS, N.L. & LEE, M. Effect of 6-amino-nicotinamide and of added vitamin A on fusion of embryonic rat palates in vitro. J. Nutr., 93: 252-262, 1967.

- NAKAMURA, H.; YAMAWAKI, H.; FUJISAWA, H. & YASUDA, M. Effects of maternal hypervitaminosis A upon developing mouse limb buds. II. Electron microscopic investigation. *Cong. Anom.*, 14: 271-283, 1974
- NANDA, R. Triated thymidine labeling of the palatal processes of rat embryos with cleft palate induced by hypervitaminosis A. *Arch. Oral Biol.*, 16: 435-444, 1971.
- NANDA, R.; VAN DER LINDEN, P.F. & JANSEN, H.W. Production of cleft palate with dexamethasone and hypervitaminosis A in rat embryos. *Experientia*, 26: 111-112, 1970.
- NAPOLI, J.L.; PACIA, E.B. & SALERNO, G.J. Cholate effects on all-trans-retinyl palmitate hydrolysis in tissue homogenates: solubilization of multiple kidney membrane hydrolases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 274 (1): 192-199, 1989.
- NELKEN, D.; PICK, E.; GABRIEL, M.; BITTERMAN, W. & BOSS, J.H. Vitamin A induced rejection of autographs and homographs. *Nature*, 205: 1022, 1965.
- NEW, D.A.T. Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev.*, 53: 107, 1978.
- NEWELL-MORRIS, L.; SIRIANNI, J.E.; SHEPARD, T.H.; FANTEL, A.G. & MOFFET, B.C. Teratogenic effects of retinoic acid in pigtail monkeys (*Macaca nemestrina*) II. Craniofacial features. *Teratology*, 22: 87-101, 1980.
- OLSSON, J.A. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of  $\beta$ -carotene into vitamin A. *J. Nutr.*, 119: 105-108, 1989.
- ONG, D.E. & CHYTIL, F. Specificity of cellular retinol-binding protein for compounds with vitamin A activity. *Nature*, 255: 74-75, 1975.

- ONG, D.E. & CHYTIL, F. Changes in levels of cellular retinol and retinoic-acid-binding proteins of liver and lung during perinatal development of rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 3976-3978, 1976.
- OSBORNE, T.B. & MENDEL, L.B. The influence of cod liver oil and some other fats on growth. J. Biol. Chem., 17: 401-408, 1914.
- O'TOOLE, B.A.; FRADKIN, A.R.; WARKANY, J.; WILSON, J.G. & MANN, G.V. Vitamin A deficiency and reproduction in rhesus monkeys. J. Nutr., 104: 1513-1524, 1974.
- PADMANABHAN, R.; SINGH, G. & SINGH, S. Malformations of the eye resulting from a maternal hypervitaminosis A during gestation in the rat. Acta. Anat., 110: 291-298, 1981.
- PELC, S.R. & FELL, H.B. The effect of excess vitamin A on the uptake of labelled compounds by embryonic skin in organ culture. Exp. Cell. Res., 19: 99-113, 1960.
- PENNYPACKER, J.L.; LEWIS, C.A. & HASSEL, J.R. Altered proteoglycan metabolism in mouse limb mesenchyme cell cultures treated with vitamin A. Arch. Biochem. Biophys., 186: 351-358, 1978.
- PILLANS, P.I.; FOLB, P.I. & PONZI, S.F. The effect of *in vitro* administration of teratogenic doses of vitamin A during the preimplantation period in the mouse. Teratology, 37: 7-11, 1988.
- PILOTI, G. & SCORTA, A. Ipervitaminosis A gravidica e malformazioni neonatali dell'apparato urinario. Minerva Ginecol., 17: 1103-1108, 1965.
- ROSA, F.W.; WILK, A.L. & KELSEY, F.O. Teratogen update: vitamin A congeners. Teratology, 33: 355-364, 1986.

- ROUX, C.; FOURNIER, P.; DUPUIS, Y. & DUPUIS, R. Carence tératogène en vitamin A. *Biol. Néonatal*, 4: 371-3, 1962.
- SCHENEFELT, R.E. Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid. Relation to dose and stage treatment. *Teratology*, 5: 103-118, 1971.
- SHAPIRO, S.S. & POON, J.P. Retinoic acid and induced alterations of growth and morphology in an established epithelial line. *Exp. Cell. Res.*, 119: 349-359, 1979.
- SIEGEL, M.I. & MOONEY, M.P. Palatal width growth rates as the genetic determinant of cleft palate induced by vitamin A. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, 2: 187-191, 1956.
- SINGH, S. & SINGH, G. Lethality and teratogenicity of hypervitaminosis A in rats. *J. Anat. Soc. India*, 23: 89-97, 1974.
- SIVAPRASADARAO, A. & FINDLAY, J.B.C. The interaction of retinol-binding protein with its plasma-membrane receptor. *Biochem. J.*, 255: 561-569, 1988a.
- SIVAPRASADARAO, A. & FINDLAY, J.B.C. The mechanism of uptake of retinol by plasma-membrane vesic. *Biochem. J.*, 255: 571-579, 1988b.
- SMITH, F.R. & GOODMAN, D.S. Vitamin A transport in human vitamin A toxicity. *N. Engl. J. Med.*, 294: 805-808, 1976.
- SOMMER, A. New imperatives for an old vitamin (A). *J. Nutr.*, 119: 96-100, 1989.
- STEFFEK, A.J.; KING, C.T.G. & DERR, J.E. The comparative pathogenesis of experimentally induced cleft palate. *J. Or. Ther. Pharm.*, 3: 9-16, 1967.
- STREBEL, R.F.; GIRERD, J. & WAGNER, B.M. Cardiovascular calcification in rats with

- hypervitaminosis A. *Arch. Pathol.*, **87**: 290, 1969.
- TAKASE, S.; ONG, D.E. & CHITYL, F. Cellular retinol binding protein allows specific interaction of retinol with the nucleus in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **76**: 2204–2208, 1979.
- TAKAHASHI, Y.I. & SMITH, J.E. Metabolism of retinol binding-protein (RBP) in the fetal rat. *Federation Proc.*, **33**: 688, 1974.
- TAKAHASHI, Y.I.; SMITH, J.E.; WINICK, M. & GOODMAN, D.S. Vitamin A deficiency and fetal growth and development in the rat. *J. Nutr.*, **105**: 1299–1310, 1975.
- TAKAHASHI, Y.I.; SMITH, J.E. & GOODMAN, D.S. Vitamin A and retinol binding protein metabolism during fetal development in the rat. *Am. J. Physiol.*, **233**: E263–E272, 1977.
- TAKEKOSHI, S. The mechanism of vitamin A induced teratogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **12**: 263–272, 1964.
- THEODOSIS, D.T. & FRASER, F.C. Early changes in the mouse neuro epithelium preceding exencephaly induced by hypervitaminosis A. *Teratology*, **18**: 219–232, 1978.
- THOMPSON, J.N. Some aspects of the metabolism and biochemistry of vitamin A. *Proc. Nutr. Soc.*, **24**: 160–166, 1965.
- THOMPSON, J.N. & PITT, G.A.J. Vitamin A acid and hypervitaminosis A. *Nature*, **188**: 672–673, 1960.
- TUCHMANN-DU PLESSIS, H. Drug effects on the fetus. In: *Monographs on Drugs*. London, ed. Adis Press, v.2, 1975.

- VALERI, V.; CRUZ, A.R.; BRANDÃO, J.S.H. & LISON, L.A. Relationship between cell nuclear volume and deoxyribonucleic acid of cell of normal epithelium, of carcinoma "*in situ*" and of invasive carcinoma of the interine cervix. Acta Cytol., 11: 488, 1967.
- WALKER, B.E. & CRAIN, B. Effect of hypervitaminosis A on palate development in two strains of mice. Am. J. Anat., 107: 49-58, 1960.
- WARD, A.; BROGDEN, R.N.; HEEL, R.C.; SPEIGHT, T.M. & AVERY, G.S. Isotretinoin. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in acne and other skin disorders. Drugs., 28: 6-37, 1984.
- WERSING, D.O. & SWENSON, M.J. Teratogenicity of vitamin A in the canine. Fed. Proc., 26: 486, 1967.
- WILSON, J.G. Abnormalities of intra-uterine development in non-human primates. Acta Endocrinol. Sci., 166: 261-292, 1971.
- WILSON, J.G.; ROTH, C.B. & WARKANY, J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency: effect of restoration of vitamin A at various times during gestation. Am. J. Anat., 92: 189-217, 1953.
- WILSON, J.G. & WARKANY, J. Malformations in the genito-urinary tract induced by maternal vitamin A deficiency in the rat. Amer. J. Anat., 82: 357-408, 1948.
- WOLBACH, S.B. & HOWE, P.R. Tissue changes following deprivation of fat soluble A vitamin. J. Exp. Med., 42: 753-777, 1925.
- WOLBACH, S.B. & HOWE, P.R. Vitamin A deficiency in the guinea pig. Arch. Pathol. Lab. Med., 5: 239-253, 1928.

- WOLF, G. The intercellular vitamin A - binding proteins: an overview of their functions. Nutr. Rev., 49(1): 1-12, 1991.
- WOLF, G. & VARANDANI, P.T. Studies on the function of vitamin A in mucopolysaccharide biosynthesis. Biochem. Biophys. Acta., 43: 501-512, 1960.
- WONG, Y.C. & BUCK, R.C. An electron microscopy study of metaplasia of the rat tracheal epithelium in vitamin A deficiency. Lab. Invest., 24: 55-66, 1971.
- YASSAI, M.B. & MALEK, F. Newborns vitamin A in relation to sex and birth weight. J. Tropical Ped., 35: 247-249, 1989.
- YUSPA, S.H. & HARRIS, C.C. Altered differentiation of mouse epidermal cells treated with retinyl acetate *in vitro*. Exp. Cell. Res., 86: 95-105, 1974.